



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΕ ΣΥΜΠΡΑΞΗ
ΜΕ ΤΑ ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ

Διερεύνηση της παρουσίας του ιού Noda σε αλιεύματα του νότιου Αιγαίου και μελέτη της επίδρασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης, ως διαιτητικού συμπληρώματος, στην εκδήλωση και εξέλιξη ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας σε λαβράκι

Λάμπου Γ. Ειρήνη
Κτηνίατρος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Φ. Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια, Επιβλέπουσα
Εργαστήριο Ιχθυοπαθολογίας, Ιχθυολογίας και Υδατοκαλλιεργειών, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. Ε. Καραγκούνη, Διευθύντρια Ερευνών, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας, Τμήμα Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ, Αθήνα
3. Ι. Παππάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος Συμβουλευτικής Επιτροπής
Εργαστήριο Φαρμακολογίας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΚΑΡΔΙΤΣΑ 2017



UNIVERSITY OF THESSALY SCHOOL OF HEALTH SCIENCES FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE OF
THE FACULTY OF VETERINARY MEDICINE IN COOPERATION WITH THE
T.E.I OF EPIRUS**

**Investigation on Noda virus presence in fish of south Aegean region and
study of the effect of oregano essential oil supplemented feed against viral
encephalopathy and retinopathy**

**Lampou G. Eirini
Veterinarian**

ADVISOR COMMITTEE

1. F. Athanassopoulou, Professor, Supervisor
Laboratory of Fish Diseases and Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Thessaly
2. E. Karagouni, Research director, Member of advisory committee
Laboratory of Cellular Immunology, Department of Microbiology, Hellenic
Pasteur Institute, Greece
3. Pappas, Associate Professor, Member of advisory committee
Laboratory of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of
Thessaly

KARDITSA, 2017

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια (Viral Encephalopathy and Retinopathy, VER) είναι μία νευροπαθολογική νόσος των ψαριών που προσβάλλει μεγάλο εύρος ιχθύων, ιδίως στο θαλάσσιο περιβάλλον. Αιτιολογικός παράγοντας της νόσου είναι ένας RNA-ιός, που ανήκει στο γένος *Betanodavirus* της οικογένειας *Nodaviridae* (Carstens *et al.*, 2000). Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η διερεύνηση της παρουσίας Betanoda-ιών σε άγρια και εκτρεφόμενα είδη ψαριών που απαντώνται στα θαλάσσια ύδατα του νοτίου Αιγαίου και η μελέτη της επίδρασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης, ως διαιτητικού συμπληρώματος, στην εκδήλωση και εξέλιξη της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας στο ευρωπαϊκό λαβράκι, *Dicentrarchus labrax*. Στο πρώτο σκέλος των πειραματισμών, ομαδοποιημένα δείγματα εγκεφάλου, προερχόμενα από άγρια και εκτρεφόμενα είδη ιχθύων της περιοχής του νότιου Αιγαίου αναλύθηκαν με δοκιμή real-time PCR για τον εντοπισμό γενώματος Betanoda-ιών. Ένα στέλεχος του ιού, που κατόπιν φυλογενετικής ανάλυσης ταξινομήθηκε στον γενότυπο RGNNV, ανιχνεύθηκε σε άτομα γλώσσας, *Solea solea*. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι η γλώσσα είναι ένα ιδιαίτερα ευαίσθητο είδος στη μόλυνση από Betanoda-ιούς. Επιπροσθέτως, ο γενότυπος RGNNV φαίνεται να απαντάται συχνότερα στα ελληνικά θαλάσσια ύδατα. Στο δεύτερο σκέλος της πειραματικής διαδικασίας αξιολογήθηκε η επίδραση που έχει η χορήγηση διατροφικού συμπληρώματος αιθέριου ελαίου ρίγανης στην πρόληψη της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας, μετά από ενδομυϊκό ενοφθαλμισμού ιού RGNNV σε ιχθύδια λαβρακιού που διατράφηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτού. Κατόπιν της χορήγησης του ιού, διενεργήθηκαν δειγματοληψίες σε 7 καθορισμένα χρονικά σημεία, προκειμένου να αξιολογηθεί η παρουσία ιικού γενώματος στον εγκέφαλο των ιχθυδίων. Κλινική συμπτωματολογία τυπική ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας εκδηλώθηκε στον πειραματικό πληθυσμό και των τριών ομάδων που ενοφθαλμίστηκαν τον ιο RGNNV. Μολονότι δεν σημειώθηκαν στατιστικώς

σημαντικές διαφορές στους μέσους όρους των τίτλων του ιού και του ποσοστού συσσωρευτικής θνησιμότητας μεταξύ των πειραματικών ομάδων, διαπιστώθηκε καθυστέρηση και σαφώς ηπιότερη εκδήλωση θνησιμότητας και κλινικών συμπτωμάτων της νόσου στην πειραματική ομάδα που διατράφηκε με την υψηλότερη συγκέντρωση αιθέριου ελαίου ρίγανης. Τα εν λόγω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης, όταν χορηγείται ως διαιτητικό συμπλήρωμα σε ιχθείς, ενδεχομένως ασκεί ευεργετική και προστατευτική δράση έναντι της μόλυνσης από ιούς Noda.

ABSTRACT

Viral encephalopathy and retinopathy (VER), otherwise known as viral nervous necrosis (VNN), is a severe neuropathological infectious disease, affecting a wide range of fish species worldwide, mostly in marine environments. The causative agent of VER is a small, icosahedral, non-enveloped RNA virus classified in the genus *Betanodavirus* of the family Nodaviridae. The aim of the current study was to investigate the occurrence of Betanodaviruses in selected fish from south Aegean region and to study the effect of oregano essential oil supplemented feed against VER. For this purpose, two experiments were conducted. In the first experiment, brain samples from wild and farmed populations of marine fish were analyzed with a real-time PCR assay designed to detect all Nodaviruses. A Betanodavirus classified in the RGNNV genotype was detected in one sample from *Solea solea* fish species. Results revealed that *Solea solea* is susceptible to Betanodavirus infection. Moreover, RGNNV genotype seems to be most common in the Greek territorial waters. In the second experiment, the effect of oregano essential oil supplemented feed against Betanodavirus was assessed, after intramuscular inoculation of *Dicentrarchus labrax* juveniles with RGNNV. Sample collection took place at 7 time points in order to examine the virus presence on the fish brain. Clinical signs and mortality were developed in all experimental groups. Although, there were no statistically significant differences in cumulative mortality percentage and RGNNV titers among the groups, delayed mortality effects and milder clinical signs were established in the fish group fed the highest essential oil concentration. This indicates that there is possible protective effect of oregano essential oil supplemented feed against Betanodavirus infection.

Η μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιχθυολογίας – Ιχθυοπαθολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε συνεργασία με το Διαγνωστικό Εργαστήριο του Τμήματος Κτηνιατρικής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και το Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

Πηγή χρηματοδότησης είναι το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) - Ευρωπαϊκή

Ένωση και Εθνικοί Πόροι.

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: "ΘΑΛΗΣ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ - Ανάλυση μηχανισμών ανοσοπαθογένειας σε φυσικές και πειραματικές μολύνσεις ιχθύων με Nodavirus: σημασία της μόλυνσης στη δημόσια υγεία" (MIS375267).



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά την κα Φωτεινή Αθανασοπούλου, Καθηγήτρια του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύπλευρη και διαρκή υποστήριξη της όλα αυτά τα χρόνια, αλλά και για την καθοδήγησή της στη συγγραφή της μεταπτυχιακής διατριβής.

Ευχαριστώ την κα Ευδοκία Καραγκούνη, Διευθύντρια Ερευνών του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, για τη συμβολή της στον σχεδιασμό και την εκτέλεση των πειραματικών μολύνσεων και ιδιαίτερα για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπαιδευτώ στις μοριακές τεχνικές και τις κυτταροκαλιέργειες στο Εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστερ.

Ακόμη ευχαριστώ τον κ. Ιωάννη Παππά, Καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής Π.Θ, για τις πολύτιμες συμβουλές του ως μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής στη συγγραφή της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω τον κ. Χρυσόστομο Δόβα, Επίκουρο καθηγητή του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ., για την καταλυτική συμβολή του στην ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στην κα Κωνσταντίνα Μπιτχαβά, Ερευνήτρια του Ινστιτούτου Κτηνιατρικών Ερευνών Θεσσαλονίκης, για την ανεκτίμητη και ουσιαστική συμβολή της στην υλοποίηση κάθε φάσης της μεταπτυχιακής διατριβής.

Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια κα Δήμητρα Τουμπανάκη και τον υποψήφιο διδάκτορα κ. Ταξιάρχη Χασαλεύρη, για τις συμβουλές τους και τη βοήθειά τους σε σχέση με τις μοριακές τεχνικές.

Την κα Μαρία Ιερωνυμάκη και τον κ. Μανώλη Περάκη για την προσφορά αλιευμάτων από το νότιο Αιγαίο και τον κ. Δημήτρη Κατσάρα, για τη βοήθειά του στην επεξεργασία των αλιευμάτων .

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Γιώργο και Τερέζα, και την αδελφή μου, Κωνσταντίνα, για την αγάπη και την έμπρακτη συμπαράστασή τους σε κάθε βήμα της ζωής μου.

Τέλος, ευχαριστώ τον σύντροφό μου Γιάννη, που στέκεται στο πλευρό μου με υπομονή, επιμονή και αγάπη και στηρίζει κάθε μου προσπάθεια.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ABSTRACT	5
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
Περιεχόμενα	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1.1 ΟΙ NODA-ΙΟΙ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ	12
1.1.1 Αρχιτεκτονική δομή, μορφολογία και σύσταση των Betanoda-ιών	13
1.1.2 Γενότυποι και φυλογενετική συγγένεια των Betanoda-ιών	16
1.1.3 Ορότυποι των Betanoda-ιών	19
1.1.4 Γεωγραφική εξάπλωση των Betanoda-ιών και είδη ψαριών στα οποία έχει ανευρεθεί ...	20
1.1.5 Επιβίωση Betanoda-ιών στο εξωτερικό περιβάλλον	21
1.1.6 Επίδραση φυσικοχημικών παραγόντων	22
1.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΥ - ΞΕΝΙΣΤΗ	23
1.2.1 Οριζόντια μετάδοση	23
1.2.2 Κάθετη μετάδοση	24
1.2.3 Είσοδος και πολλαπλασιασμός του ιού στον οργανισμό	25
1.2.4 Ανοσολογική απόκριση έναντι Betanoda-ιών	26
1.3 Η ΙΟΓΕΝΗΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΠΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑ	29
(VIRAL ENCEPHALOPATHY AND RETINOPATHY, VER)	29
1.3.1 Παθογένεια της νόσου	30
1.3.2 Κλινική εικόνα της νόσου	31
1.3.3 Υποκλινική μόλυνση	33
1.3.4 Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις	34
1.3.5 Διάγνωση	37
1.3.5.1 Κλινική εικόνα	37
1.3.5.2 Εργαστηριακή διάγνωση	37
1.3.6 Πρόληψη	47
1.3.6.1 Χημειοθεραπευτικές ουσίες	49
1.3.6.2 Εμβολιασμοί	50
1.4 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΡΙΓΑΝΗΣ	55
1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ	58
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	59
2.1 Δειγματοληψίες	59
2.2 Εγκαταστάσεις και συνθήκες διατήρησης πειραματικού πληθυσμού	61
2.3 Πειραματικός πληθυσμός	62
2.4 Σιτηρέσιο εκτροφής πειραματικού πληθυσμού	63
2.5 Ιός πειραματικής μόλυνσης	63
2.6 Πρωτόκολλο πειραματικής μόλυνσης και δειγματοληψιών	64
2.7 Εκχύλιση ολικού RNA	65

2.7.1 Ιστοί που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση ολικού RNA	65
2.7.2 Αντιδραστήρια εκχύλισης ολικού RNA	65
2.7.3 Μέθοδος εκχύλισης ολικού RNA (RNA extraction method)	66
2.8 Real-time PCR ενός σταδίου για την ανίχνευση του ιού Noda	67
2.8.1 Εκκινητές και φθορίζον ολιγονουκλεοτίδιο «Taqman probe»	67
2.8.2 Δοκιμασία real-time PCR ενός σταδίου	68
2.9 Πρότυπη καμπύλη τιτλοποίησης	69
2.10 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	71
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	72
3.1 Πείραμα 1 ^ο	72
3.1.1 Ανίχνευση ιού Noda σε αλιεύματα του Νοτίου Αιγαίου	72
3.2 Πείραμα 2 ^ο	73
3.2.1 Κλινική εικόνα ιχθυδίων μετά τον ενοφθαλμισμό	73
3.2.2 Τίτλοι ιού RGNNV	78
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	81
4.1 Πείραμα 1 ^ο	81
4.2 Πείραμα 2 ^ο	84
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	90
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	121

Κατάλογος πινάκων, εικόνων, γραφημάτων

Πίνακας 1: Γενοτυπική και ορολογική ταξινόμηση Betanoda-ίων (πηγές: Nishizawa et al., 1995; Mori et al., 2003; Iwamoto et al., 2000)	20
Πίνακας 2: Είδη, αριθμός, προέλευση και σωματομετρικά χαρακτηριστικά των αλιευμάτων ..	59
Πίνακας 3: Εκκινητές και ιχνηλάτες που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή real-time PCR για την ανίχνευση Betanoda-ίων	68
Πίνακας 4: Αποτελέσματα ανάλυσης real-time PCR	72
Πίνακας 5: Θνησιμότητα λαβρακίων ανά πειραματική ομάδα	74
Πίνακας 6: Τίτλοι ιού RRNNV σε δείγματα εγκεφάλου λαβρακίων από κάθε πειραματική ομάδα	79
Πίνακας 7: Περιγραφική ανάλυση τίτλων ιού RGNNV μεταξύ των τριών πειραματικών ομάδων σε κάθε χρονικό σημείο	121
Πίνακας 8: Έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων (τίτλοι ιού RGNNV)	122
Πίνακας 9: Έλεγχος ομοιογένειας των δεδομένων (τίτλοι ιού RGNNV)	122
Πίνακας 10: Έλεγχος σφαιρικότητας των δεδομένων (τίτλοι ιού RGNNV)	122
Πίνακας 11: Έλεγχοι στατιστικών υποθέσεων με ανάλυση διακύμανσης	123
Πίνακας 12: Έλεγχος στατιστικής υπόθεσης με ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων	125
Πίνακας 13: Περιγραφική ανάλυση ημερήσιου ποσοστού θνησιμότητας	126
Πίνακας 14: Έλεγχος κανονικότητας δεδομένων ημερήσιου ποσοστού θνησιμότητας	126
Πίνακας 15: Έλεγχος ομοιογένειας δεδομένων ημερήσιου ποσοστού θνησιμότητας	127
Πίνακας 16: Έλεγχος στατιστικής υπόθεσης με ανάλυση διακύμανσης	127

Εικόνα 1: Δομή ενός Grouper Nervous Necrosis Virus-like particle (GNNV- LP). (Α) υπομονάδα C του GNNV-LP. Φαίνονται με γκρι χρώμα το άκρο N-ARM, με μωβ χρώμα ο N –βραχίονας (N-arm), με κόκκινο χρώμα η S-περιοχή (S-domain), με κυανό χρώμα η P-περιοχή (P- domain), με μπλε χρώμα η περιοχή σύνδεσης (Linker region) και με κίτρινο χρώμα τα ιόντα ασβεστίου (Ca ²⁺ ion) (Β) Τοπολογία του GNNV-LP, με τις έλικες και τα σκέλη να παριστάνονται με κυλίνδρους και βέλη, αντίστοιχα. (Πηγή: Chen et al., 2015)	14
Εικόνα 2: Σχηματική παράσταση του γενώματος των Betanoda-ιών (πηγή: viral zone).....	15

Γράφημα 1: Καμπύλες φθορισμού που προέκυψαν από τις υποδεκαπλάσιες αραιώσεις ιού-αναφοράς	70
Γράφημα 2: Πρότυπη καμπύλη τιτλοποίησης του ιού	70
Γράφημα 3: Εξέλιξη της θνησιμότητας στην ομάδα θετικών μαρτύρων	75
Γράφημα 4: Εξέλιξη της θνησιμότητας στην ομάδα που διατράφηκε με αιθέριο έλαιο ρίγανης, συγκέντρωσης 1000ppm	76
Γράφημα 5: Εξέλιξη της θνησιμότητας στην ομάδα που διατράφηκε με αιθέριο έλαιο ρίγανης, συγκέντρωσης 2000ppm	77
Γράφημα 6: Εξέλιξη ημερήσιου ποσοστού θνησιμότητας	77
Γράφημα 7: Εξέλιξη συσσωρευτικής θνησιμότητας ανά ομάδα.....	78
Γράφημα 8: Μέσος όρος τίτλων τ ιού RGNNV που ανιχνεύθηκαν με real time RT-PCR στις δύο πειραματικές ομάδες που διατράφηκαν με 1000 ppm και 2000 ppm αιθέριου ελαίου ρίγανης καθώς και στην ομάδα ελέγχου που διεδράφη με εμπορική τροφή.....	80

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΙ NODA-ΙΟΙ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

Οι Noda-ιοί που προσβάλλουν τα ψάρια είναι RNA ιοί που ανήκουν στο γένος *Betanodavirus*, της οικογένειας Nodaviridae (Carstens *et al.*, 2000). Στην οικογένεια αυτή περιλαμβάνεται και το γένος *Alphanodavirus*, στο οποίο ταξινομούνται Noda-ιοί που προσβάλλουν κυρίως έντομα (Schneemann and Marshall, 1998).

Πρώτος ιός της οικογένειας Nodaviridae, από τον οποίο έλαβε και το όνομά της, είναι ο ιός Nodamura που απομονώθηκε από κουνούπι (*Culex tritaeniorhynchus*) κοντά στο χωριό Nodamura (σημερινό Nodashi) της Ιαπωνίας το 1956 (Scherer and Hurlbut, 1967). Noda-ιοί ανιχνεύθηκαν για πρώτη φορά σε ψάρια, στις αρχές της δεκαετίας του '90 (Yoshikoshi and Inoue, 1990· Glazebrook *et al.*, 1990· Bloch *et al.*, 1991· Breuil *et al.*, 1991· Mori *et al.*, 1992· Comps *et al.*, 1994· Nishizawa *et al.*, 1994) και χαρακτηρίστηκαν ως αιτιολογικοί παράγοντες μιας σοβαρής νόσου που μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλες απώλειες προνυμφών αλλά και ψαριών μεγαλύτερου μεγέθους (Munday *et al.*, 2002), της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας.

Η ταξινόμηση των Noda-ιών που απομονώνονταν από ψάρια σε ένα ξεχωριστό γένος εντός της οικογένειας Nodaviridae προτάθηκε από τους Nagai and Nishizawa (1999), καθώς διαπιστώθηκε μικρή ομοιότητα στις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων μεταξύ των Noda-ιών που ανευρίσκονταν σε ψάρια και εκείνων που απομονώνονταν από έντομα (Nishizawa *et al.*, 1995). Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στην καθιέρωση των γενών *Alphanodavirus* και *Betanodavirus* εντός της οικογένειας Nodaviridae, που προσβάλλουν έντομα και ψάρια αντίστοιχα. Η ταξινόμηση αυτή έγινε αποδεκτή στην 7^η έκθεση της Διεθνούς Επιτροπής για την Ταξινόμηση των ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV).

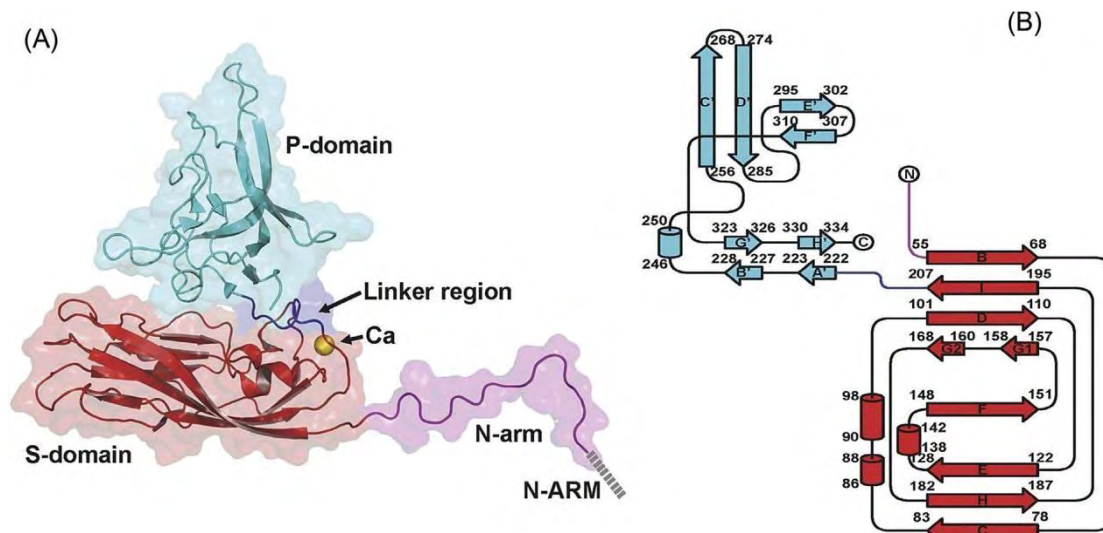
Η ονοματολογία των γενότυπων και των ειδών του γένους *Betanodavirus* προέρχεται συνήθως από την κοινή ονομασία του είδους των ψαριών από τα οποία απομονώνονται, σε συνδυασμό με την κατάληξη NNV (Nervous Necrosis Virus). Έτσι προέκυψαν ονομασίες όπως BFNNV (Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus) ή SBNNV (Sea Bass Nervous Necrosis Virus). Ωστόσο, σε ορισμένες δημοσιεύσεις απαντάται η κατάληξη NV (Nodavirus), όπως για παράδειγμα στον ιό AHNV (Atlantic Halibut Nodavirus) και στον ιό TNV (Turbot Nodavirus). Το συνθετικό EV (encephalitis virus) σε συνδυασμό με το επιστημονικό όνομα του ψαριού έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις όπως αυτή του ιού DIEV (*Dicentrarchus labrax* Encephalitis Virus) και LcEV (*Lates calcarifer* Encephalitis Virus).

1.1.1 Αρχιτεκτονική δομή, μορφολογία και σύσταση των *Betanoda*-ιών

Το σωματίδιο των *Betanoda*-ιών έχει σχήμα σφαιρικό, με διάμετρο 25 - 34 nm. Αποτελείται από το καψίδιο και το γένωμα και δεν περιβάλλεται από φάκελο. Η ύπαρξη ενός πυκνωτικού πυρήνα, διαμέτρου 13 – 21 nm που περιβάλλεται από μια διαυγή περιοχή διαμέτρου περίπου 5 nm έχει αναφερθεί από ορισμένους συγγραφείς, μετά από ηλεκτρονική μικροσκόπηση (Breuil *et al.*, 1991· Bloch *et al.*, 1991). Τα ιικά σωματίδια σχηματίζουν παρακρυσταλλικές συστοιχίες και ανευρίσκονται είτε ελεύθερα στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων, είτε συνδεδεμένα με τη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (Glazebrook *et al.*, 1990· Breuil *et al.*, 1991· Bloch *et al.*, 1991· Boonyaratpalin *et al.*, 1996).

Το καψίδιο εμφανίζει εικοσαεδρική συμμετρία, αποτελείται από 32 καψομερίδια και συγκροτείται από μία δομική πρωτεΐνη (42 kDa), την CP (coat protein) ή α πρωτεΐνη.

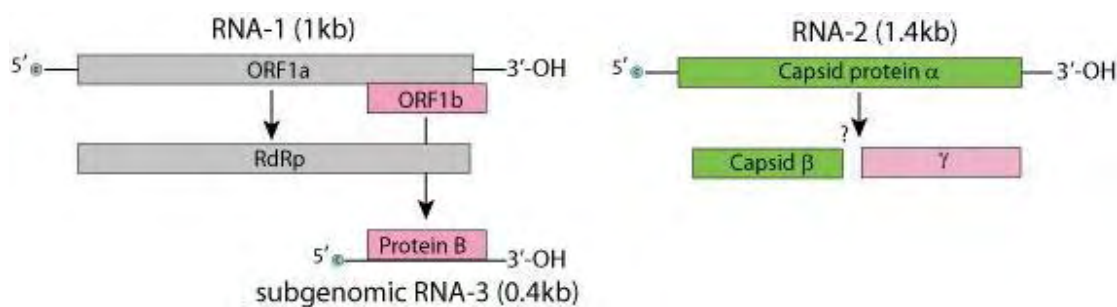
Σε μια πρόσφατη έρευνα, στην οποία μελετήθηκε η κρυσταλλική δομή ενός όμοιου του GNNV σωματιδίου (Grouper Nervous Necrosis Virus-Like Particle, GNNV-LP) παρατηρήθηκε ότι η καψιδιακή πρωτεΐνη (CP) παρουσιάζει τρία μείζονα επίπεδα: Έναν N-τερματικό βραχίονα (επέκταση εντός της υπομονάδας στην εσωτερική επιφάνεια), μία ζελατινώδη S- περιοχή (shell domain) και μία προεξέχουσα P-περιοχή (protrusion domain) που σχηματίζεται από τριμερείς προεξοχές (Chen *et al.*, 2015).



Εικόνα 1: Δομή ενός Grouper Nervous Necrosis Virus-like particle (GNNV- LP). (A) υπομονάδα C του GNNV-LP. Φαίνονται με γκρι χρώμα το άκρο N-ARM, με μωβ χρώμα ο N –βραχίονας (N-arm), με κόκκινο χρώμα η S-περιοχή (S-domain), με κυανό χρώμα η P-περιοχή (P-domain), με μπλε χρώμα η περιοχή σύνδεσης (Linker region) και με κίτρινο χρώμα τα ιόντα ασβεστίου (Ca²⁺ ion) (B) Τοπολογία του GNNV-LP, με τις έλικες και τα σκέλη να παριστάνονται με κυλίνδρους και βέλη, αντίστοιχα. (Πηγή: Chen *et al.*, 2015)

Το γένωμα των Betanoda-ιών απαρτίζεται από δύο θετικής πολικότητας μόρια γραμμικού μονόκλωνου RNA (ssRNA), το RNA1 και το RNA2 γενωμικό τμήμα. Τα δύο μόρια φέρουν καλύπτρα στο 5'-άκρο τους και δεν έχουν πολύ-A ουρά στο 3'-άκρο (Mori *et al.*, 1992' Nagai and Nishizawa 1999' Takizawa *et al.*, 2008' Chen, Su and Hong, 2009). Το RNA1 γενωμικό τμήμα έχει μέγεθος 3.100 βάσεων, περιέχει ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) και κωδικοποιεί μία μη δομική πρωτεΐνη (ένζυμο), την RNA πολυμεράση, γνωστή και ως πρωτεΐνη A (Nagai and Nishizawa, 1999). Η πρωτεΐνη A (110 kDa) είναι απαραίτητη για την αντιτύπωση του ιικού γενώματος κατά τη διάρκεια της μόλυνσης (Ball and Johnson, 1999' Nagai and Nishizawa, 1999). Το RNA2 γενωμικό τμήμα, έχει μέγεθος 1.400 βάσεων, περιέχει

ένα ανοικτό πλαίσιο οργάνωσης (ORF) και κωδικοποιεί την καψιδιακή πρωτεΐνη CP (Nagai and Nishizawa, 1999). Στο RNA2 τμήμα διακρίνεται μία συντηρημένη και μία μεταβλητή περιοχή (T4 περιοχή), η οποία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ειδικότητα του ξενιστή κάθε Betanoda-ιού (Ito *et al.*, 2008). Η ταξινόμηση των Betanoda-ιών σε τέσσερις γενότυπους βασίστηκε στη νουκλεοτιδική αλληλουχία της T4 περιοχής (Nishizawa *et al.*, 1997).



Εικόνα 2: Σχηματική παράσταση του γενώματος των Betanoda-ιών (πηγή: viral zone)

Κατά τη διάρκεια του ιικού πολλαπλασιασμού, οι Betanoda-ιοί συνθέτουν από το 3'-άκρο του RNA1, ένα υπογενωμικό τμήμα, το οποίο καλείται RNA3. Το RNA3 υπογενωμικό τμήμα φέρει δύο υποθετικά ORFs, που κωδικοποιούν δύο μη δομικές πρωτεΐνες, τις B1 (111 aa) και B2 (75 aa) (Wu *et al.*, 2008· Iwamoto *et al.*, 2005· Ball and Johnson, 1999).

Η πρωτεΐνη B1, εκφράζεται στα αρχικά στάδια της μόλυνσης και θεωρείται ότι επιτελεί αντινεκρωτικές λειτουργίες, επιμηκύνοντας έτσι τη διάρκεια ζωής των κυττάρων (Chen, Su and Hong, 2009). Η πρωτεΐνη B2 είναι απαραίτητη για την ενδοκυτταρική συσσώρευση του ιικού RNA και δρα ως ανταγωνιστής του μηχανισμού παρεμβολής του κυτταρικού RNA στον πολλαπλασιασμό του ιικού RNA (Fenner *et al.*, 2006).

Η πρωτεΐνη B2 ανιχνεύεται σε πρόσφατες και όχι χρόνιες μολύνσεις, γεγονός που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη διαφοροποίηση μιας πιθανά ενεργού λοίμωξης από μία εμμένουσα λοίμωξη (Mézeth *et al.*, 2009).

1.1.2 Γενότυποι και φυλογενετική συγγένεια των *Betanoda*-ιών

Οι *Betanoda*-ιοί έχουν ταξινομηθεί σε τέσσερις γενότυπους, σύμφωνα με φυλογενετική ανάλυση που βασίστηκε στην αλληλουχία των νουκλεοτιδίων της T4 μεταβλητής περιοχής του RNA2 γενωμικού τμήματος: τον Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV), τον Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus (TPNNV), τον Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) και τον Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus (BFNNV) (Nishizawa *et al.*, 1997). Η απόδοση των ανωτέρω ονομασιών, σχετίζεται με το ψάρι από το οποίο είχαν απομονωθεί οι ιοί που κατατάσσονται στον κάθε γενότυπο. Οι γενότυποι SJNNV και TPNNV ονομάστηκαν έτσι από το κοκάλι (Striped jack, *Pseudocaranx dentex*, Bloch and Schneider) και το ψάρι tiger puffer (*Takifugu rubripes*, Temmick and Schegel), αντίστοιχα. Ο γενότυπος RGNNV πήρε το όνομά του από το ψάρι red spotted grouper (*Epinephelus akaara*), ενώ ο γενότυπος BFNNV, από το ψάρι barfin flounder (*Verasper moseri*). Η κατάταξη αυτή έγινε ευρέως αποδεκτή και έχει χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό πληθώρας απομονώσεων *Noda*-ιών σε διαφορετικές χώρες (Aspehaug *et al.*, 1999· Starkey *et al.*, 2000· Dalla Valle *et al.*, 2001· Skliris *et al.*, 2001· Johnson *et al.*, 2002· Chi, Shieh and Lin, 2003· Johansen *et al.*, 2004).

Μία διαφορετική ονομασία για τους γενότυπους των *Betanoda*-ιών, που δεν σχετίζεται με το ψάρι ξενιστή, προτάθηκε από τους Thiery και συνεργάτες (2004). Σύμφωνα με αυτή, οι γενότυποι των *Betanoda*-ιών χαρακτηρίζονται με τους λατινικούς αριθμούς I, II, III και IV που θανατοποκρίνονται στους γενότυπους RGNNV, BFNNV, TPNNV και SJNNV αντίστοιχα, ενώ δημιουργούνται υποομάδες εντός αυτών. Έτσι, ο γενότυπος II υποδιαιρείται σε τρεις υποομάδες (α, β, γ), αντανakλώντας γονιδιακές διαφορές μεταξύ απομονώσεων από atlantic cod (IIa), barfin flounder (IIb) και atlantic halibut/ european sea bass (IIc). Το 2007 οι Toffolo και συνεργάτες ανέφεραν την πρώτη φυλογενετική ανάλυση *Betanoda*-ιών με βάση την αλληλουχία τόσο του RNA1 όσο και του RNA2 γενωμικού τμήματος. Η ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών και των δύο

γενωμικών τμημάτων του RNA των ιών, δεν αναίρεσε την κατάταξή τους σε τέσσερις γενότυπους. Εκτός των τεσσάρων γενότυπων που αναφέρθηκαν, έχουν προταθεί επιπλέον δύο, λόγω γενετικών διαφορών στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες νέων απομονώσεων: ο γενότυπος Atlantic Cod Nervous Necrosis Virus (ACNNV) (Gagne *et al.*, 2004) και ο γενότυπος Turbot Nodavirus (TNV) (Johansen *et al.*, 2004). Ωστόσο μόνο ο ACNNV έχει θεωρηθεί αποδεκτός ως πέμπτος γενότυπος από ορισμένους συγγραφείς, ενώ ο TNV πιθανά ανήκει στον γενότυπο BFNNV (Moody *et al.*, 2009· Nylund *et al.*, 2008· Binesh, Greeshma and Jithendran, 2013).

Οι διαφορετικοί γενότυποι παρουσιάζουν διαφορετικό εύρος ξενιστών και διακριτή γεωγραφική κατανομή, ως αποτέλεσμα της προσαρμογής τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες νερού (Cherif *et al.*, 2009· Binesh, Greeshma and Jithendran, 2013· Vendramin *et al.*, 2014). Η συσχέτιση μεταξύ των τεσσάρων γενότυπων και της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης τους έχει μελετηθεί *in vitro* (BFNNV 15 - 20°C, TPNNV 20°C, SJNNV 20 - 25°C και RGNNV 25 -30°C) (Iwamoto *et al.*, 2000). Ωστόσο, διαφορετικοί γενότυποι έχουν ανευρεθεί στον ίδιο ξενιστή (Lopez-Simena *et al.*, 2010· Panzarin *et al.*, 2012), ενώ Betanoda-ιοί υψηλής συγγένειας, με τα ίδια γενετικά χαρακτηριστικά, έχουν την ικανότητα να μολύνουν είδη ψαριών που ανήκουν σε διαφορετικές τάξεις (Panzarin *et al.*, 2012). Επιπλέον, γενετικά διακριτά στελέχη, μπορούν να ανιχνευθούν σε πληθυσμούς ενός συγκεκριμένου είδους ψαριού σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές (Thiery *et al.*, 1999α), ενώ διπλή μόλυνση από RGNNV και Megalocytivirus έχει επίσης αναφερθεί σε groupers (Kuo *et al.*, 2012a).

Ειδικότερα, ο γενότυπος RGNNV έχει το μεγαλύτερο εύρος ξενιστών καθώς τα στελέχη του έχουν απομονωθεί από μία πληθώρα θερμόφιλων ειδών ψαριών σε μεγάλο γεωγραφικό εύρος κατανομής (Munday *et al.*, 2002). Ο γενότυπος BFNNV έχει απομονωθεί από ψυχρόφιλα είδη ψαριών (atlantic halibut, pacific cod, atlantic cod, european sea bass, dover sole και barfin flounder) στη Βόρεια Αμερική, τη Νορβηγία, τη Σκωτία, τις γαλλικές ακτές που βρέχονται από τον Ατλαντικό ωκεανό και την Ιαπωνία

(Grotmol *et al.*, 2000· Starkey *et al.*, 2000,2001). Ο γενότυπος TPNNV έχει ανευρεθεί σε ένα είδος ψαριού (κοκάλι) στην Ιαπωνία (Nishizawa *et al.*, 1997). Όσον αφορά στον γενότυπο SJNNV, είχε αρχικά θεωρηθεί ότι προσβάλλει λίγα είδη ψαριών που διαβιούν στα ιαπωνικά ύδατα (Nishizawa *et al.*, 1997· Munday *et al.*, 2002). Στη συνέχεια ανιχνεύθηκε σε γλώσσα (Thiery *et al.*, 2004· Cutrin *et al.*, 2007), όπως επίσης και σε εκτρεφόμενη τσιπούρα και λαβράκι στην ιβηρική χερσόνησο (Cutrin *et al.*, 2007). Ωστόσο, φυλογενετική ανάλυση και των δύο γενωμικών τμημάτων (RNA1 και RNA2) σε μεταγενέστερη έρευνα, υποδήλωσε ότι τα περισσότερα από τα ανωτέρω στελέχη που είχαν ταξινομηθεί στον γενότυπο SJNNV, ήταν στην πραγματικότητα γενετικοί ανασυνδυασμοί των γενοτύπων RGNNV και SJNNV (Oliveira *et al.*, 2009). Το 2007, οι Tofolo και συνεργάτες ανέφεραν ότι δύο απομονώσεις από μία ομάδα 27 Betanoda-ιών έφεραν RNA1 γενωμικό τμήμα του γενότυπου SJNNV και RNA2 γενωμικό τμήμα του γενότυπου RGNNV. Και τα δύο ανασυνδυασμένα στελέχη απομονώθηκαν από λαβράκια με κλινική συμπτωματολογία από την περιοχή της Ιταλίας και της Κροατίας. Η συνύπαρξη των γενοτύπων RGNNV και SJNNV σε ένα άγριο ψάρι έχει επίσης αναφερθεί από τους Lopez- Zimena και συνεργάτες (2010), γεγονός που πιθανά υποδεικνύει ανασυνδυασμό γενωμικών τμημάτων. Μία άλλη φυλογενετική ανάλυση που βασίστηκε στην αλληλούχιση του RNA1 και RNA2 γενωμικού τμήματος σε 120 δείγματα από τη νότια Ευρώπη, κατέδειξε 23 ανασυνδυασμένα στελέχη (RNA1 από τον γενότυπο RGNNV, RNA2 από τον γενότυπο SJNNV), 96 στελέχη που ανήκαν στον γενότυπο RGNNV και 1 που ανήκε στον γενότυπο SJNNV (Panzarin *et al.*, 2012). Μέχρι στιγμής γενετικά ανασυνδυασμένες απομονώσεις Betanoda-ιών έχουν ανευρεθεί μόνο στην περιοχή της νοτίου Ευρώπης (He και Teng, 2015), με τον RGNNV/SJNNV ανασυνδυασμό να ανευρίσκεται πιο συχνά σε σχέση με τον SJNNV/RGNNV (Oliveira *et al.*, 2009· Panzarin *et al.*, 2012). Μεταξύ των απομονώσεων που κατατάσσονται στους τέσσερις γνωστούς γενότυπους και τα ανασυνδυασμένα στελέχη, φαίνεται να υπάρχουν διαφοροποιήσεις στη λοιμογόνο ικανότητα. Πιο συγκεκριμένα, ο RGNNV/SJNNV ανασυνδυασμός μπόρεσε να προκαλέσει κλινικά συμπτώματα σε ευρωπαϊκό λαβράκι, κάτι όμως που δεν ήταν σε θέση να προκαλέσει ο γενότυπος SJNNV (Souto *et al.*,

2015). Επιπλέον ο γενότυπος RGNNV, SJNNV και ο ανασυνδυασμός RGNNV/SJNNV προκάλεσαν όλοι υψηλή θνησιμότητα σε γλώσσα, *Solea senegalensis*, αλλά το ανασυνδυασμένο στέλεχος ήταν τόσο λοιμογόνο ώστε να σκοτώσει όλα τα νοσούντα ψάρια μέσα σε δύο μέρες από τον ενοφθαλμισμό του ιού (Souto *et al.*, 2015). Πιθανά όλα τα RGNNV/SJNNV στελέχη που ανευρίσκονται, είναι το αποτέλεσμα ενός ανασυνδυασμού, που συνέβη στις αρχές της δεκαετίας του 1980 στη νότια Ευρώπη (He and Teng, 2015). Η παρουσία ανασυνδυασμένων στελεχών, καθιστά απαραίτητη την ανάλυση και των δύο γενωμικών τμημάτων (RNA1 και RNA2) για τη σωστή ταξινόμηση των απομονώσεων (Costa and Thompson, 2016).

1.1.3 Ορότυποι των *Betanoda*-ιών

Οι Mori και συνεργάτες (2003), στηριζόμενοι σε δοκιμές ανοσοφθορισμού (IFAT) και οροεξουδετέρωσης (SN), πρότειναν την κατάταξη των *Betanoda*-ιών σε τρεις κύριους ορότυπους: τον ορότυπο A, B και C. Ο ορότυπος A αφορούσε σε στελέχη που ανήκουν στον γενότυπο SJNNV, ο ορότυπος B περιελάμβανε στελέχη που κατατάσσονται στον γενότυπο TPNNV και ο ορότυπος C αντιστοιχούσε στους γενότυπους BFNNV και RGNNV. Η μεγάλη ομοιότητα που παρατηρήθηκε στις αλληλουχίες του RNA2 γενωμικού τμήματος των γενότυπων BFNNV και RGNNV, φαίνεται ότι είναι υπεύθυνη για την κατάταξη τους σε έναν ορότυπο (Mori *et al.*, 2003). Ωστόσο, η ταξινόμηση αυτή βασίστηκε σε ασιατικές απομονώσεις και δεν περιελάμβανε στελέχη ψυχρών υδάτων και γενετικά ανασυνδυασμένα στελέχη, τα οποία αναφέρθηκαν μεταγενέστερα. Σε μια πολύ πρόσφατη περιγραφή της ορολογικής συγγένειας των *Betanoda*-ιών με τη χρήση δοκιμών οροεξουδετέρωσης, διατυπώθηκε μία άλλη εκδοχή. Σύμφωνα με αυτή, οι γενότυποι SJNNV και RGNNV είναι αντιγονικά διακριτοί, συνιστώντας τους ορότυπους A και C, αντίστοιχα. Οι γενότυποι TPNNV και BFNNV, οι οποίοι αντιπροσωπεύουν *Betanoda*-ιούς ψυχρών υδάτων, είναι αντιγονικά συγγενείς και κατατάσσονται στον ορότυπο B. Όσον αφορά γενετικά ανασυνδυασμένους

RGNNV/SJNNV και SJNNV/RGNNV ιούς, αυτοί κατατάσσονται στους ορότυπους Α και C αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η καψιδιακή πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το RNA2 γενωμικό τμήμα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της ανοσολογικής αντίδρασης (Panzarin *et al.*, 2016).

Πίνακας 1: Γενοτυπική και ορολογική ταξινόμηση *Betanoda*-ιών (πηγές: Nishizawa *et al.*, 1995· Mori *et al.*, 2003· Iwamoto *et al.*, 2000)

Γενότυπος	Ορότυπος	Κύριοι Ξενιστές	Βέλτιστη Θερμοκρασία Ανάπτυξης
Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV)	A	striped jack	20-25°C
Tiger Puffer Nervous Necrosis Virus (TPNNV)	B	tiger puffer	20°C
Red-spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV)	C	asian sea bass european sea bass red-spotted grouper Άλλα grouper	25-30°C
Barfin Flounder Nervous Necrosis Virus (BFNNV)	C	barfin flounder	15-20°C

1.1.4 Γεωγραφική εξάπλωση των *Betanoda*-ιών και είδη ψαριών στα οποία έχει ανευρεθεί

Οι *Betanoda*-ιοί έχουν παγκόσμια εξάπλωση. Έχουν ανιχνευθεί σε ψάρια από όλες τις ηπείρους, εκτός της Αφρικής, ιδίως σε περιοχές που ανθίζει η εντατική εκτροφή θαλάσσιων ειδών (Johnson *et al.*, 2002· Munday *et al.*, 2002· Nakai *et al.*, 2009). Σε αυτές τις χώρες περιλαμβάνονται η Μεσόγειος (Ισραήλ, Κροατία, Βοσνία, Ελλάδα, Μάλτα, Ιταλία, Γαλλία, Ισπανία, Πορτογαλία, Τυνησία), το Ηνωμένο Βασίλειο, η Σκανδιναβία (Νορβηγία), η νότια και ανατολική Ασία (Ιαπωνία, Κορέα, Ταϊβάν, Κίνα, Φιλιππίνες, Ταϊλάνδη, Βιετνάμ, Μαλαισία, Σιγκαπούρη, Ινδονησία, Μπρουνέι, Ινδία), η

Ωκεανία (Αυστραλία, Ταϊτή) και η Βόρεια Αμερική (Η.Π.Α., Καναδάς) (Baeck *et al.*, 2007· Chi *et al.*, 1997· Chua *et al.*, 1995· Danayadol *et al.*, 1995· Nakai *et al.*, 2009· Panzarin *et al.*, 2012· Zafran *et al.*, 2000). Αν και ορισμένα είδη του θαλασσινού νερού θεωρούνται ιδιαίτερα ευαίσθητα στη μόλυνση από Betanoda-ιούς, κρούσματα ιογενούς εγκεφαλοπάθειας ή εντοπισμός υποκλινικών φορέων της νόσου, έχουν αναφερθεί και σε ψάρια του γλυκού νερού (Chi *et al.*, 2003· Athanassopoulou, Billinis and Prapas 2004· Bigarre *et al.*, 2009· Bovo *et al.*, 2011· Jithendran *et al.*, 2011· Hegde *et al.*, 2003· Johansen *et al.*, 2003· Munday *et al.*, 2002· Lu *et al.*, 2008· Binesh, 2013· Tu *et al.*, 2016).

Επιπροσθέτως, εκτός των εκτρεφόμενων ψαριών, οι Betanoda-ιοί αποτελούν απειλή και για άγριους πληθυσμούς ψαριών, λόγω της υψηλής μολυσματικότητάς τους και του μεγάλου εύρους ξενιστών (Panzarin *et al.*, 2012).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, έχουν ανιχνευθεί σε πληθώρα ειδών που ανήκουν σε πάνω από 20 τάξεις ψαριών και διθύρων, με το εύρος των ξενιστών διαρκώς να διευρύνεται (Λάμπου, 2017).

1.1.5 Επιβίωση Betanoda-ιών στο εξωτερικό περιβάλλον

Οι Betanoda-ιοί είναι ανθεκτικοί στο υδάτινο περιβάλλον και μπορούν να επιβιώσουν για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θαλασσινό νερό σε χαμηλές θερμοκρασίες (Frerichs *et al.*, 2000). Η επιμόλυνση του υδάτινου περιβάλλοντος μετά από κρούσμα της νόσου, είναι δυνατόν να διατηρηθεί για μεγάλες χρονικές περιόδους, αποτελώντας πηγή μόλυνσης άγριων ευπαθών υδρόβιων ειδών (ΟΙΕ, 2016). Ο ιός επιβιώνει επίσης σε ψάρια διατηρημένα στην κατάψυξη, κάτι που ενδέχεται να αποτελεί κίνδυνο στις εκτροφές ψαριών που χρησιμοποιούν για διατροφή ωμά ψάρια (Mori *et al.*, 2005). Στο γλυκό νερό φαίνεται να είναι λιγότερο σταθερός και να αδρανοποιείται μετά από έξι μήνες παραμονής του (Flerichs *et al.*, 2000). Έξω από το υδάτινο περιβάλλον, οι Betanoda-ιοί

φαίνεται να χάνουν την κυτταροπαθογόνο τους δράση πολύ εύκολα· πάνω από το 99% του ιού αδρανοποιήθηκε μετά από μια περίοδο 7 ημερών στους 21°C (Maltese and Bovo, 2007).

1.1.6 Επίδραση φυσικοχημικών παραγόντων

Σύμφωνα με μελέτη των Arimoto και συνεργατών (1996), ο ιός SJNNV αδρανοποιείται μετά από επαφή διάρκειας δέκα λεπτών με υποχλωριώδες νάτριο, υποχλωριώδες ασβέστιο, χλωριούχο βενζαλκόνιο και ιώδιο, τελικής συγκέντρωσης 50 ppm. Αδρανοποιείται επίσης με αιθανόλη και μεθανόλη συγκέντρωσης 60% και 50% αντίστοιχα, με ακτινοβολία UV και σε αλκαλικό pH 12 επί 10 λεπτά στους 20°C (Arimoto *et al.*, 1996). Σε μια άλλη μελέτη από τους Frerichs και συνεργάτες (2000), διαπιστώθηκε ότι ο ιός αδρανοποιείται μετά από τέσσερις ημέρες παραμονής του στους 37°C και τρεις μήνες στους 25°C, ενώ διατηρεί τη λοιμογόνο ικανότητά του μετά από ένα χρόνο παραμονής του στους 15°C. Επιπλέον η έκθεση σε ακτινοβολία UV, ιώδιο και χλωρίνη οδηγεί στην πλήρη αδρανοποίηση του ιού. Γενικά, σε θερμοκρασίες 30 - 35°C αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός των Betanoda-ιών. Η αδυναμία πολλαπλασιασμού στους 37°C τους καθιστά ακίνδυνους για τον άνθρωπο μετά από βρώση μολυσμένου ψαριού (Hata *et al.*, 2007). Οι Betanoda-ιοί διατηρούν τη μολυσματικότητα τους σε pH 3 - 7 και όταν απομονώνονται με τη βοήθεια χλωροφορμίου (viral zone). Η πυκνότητα άνωσης σε χλωριούχο κέσιο (CsCl) των ιικών σωματιδίων του DIEV είναι περίπου 1,31 – 1,36 g/cm³ (viral zone).

1.2 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΙΟΥ - ΞΕΝΙΣΤΗ

1.2.1 Οριζόντια μετάδοση

Οι Betanoda-ιοί μεταδίδονται οριζόντια μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους αλλά και μεταξύ διαφορετικών ειδών (Mori *et al.*, 1991· Munday *et al.*, 2002). Οριζόντια μετάδοση του ιού σε φυσικές εξάρσεις της νόσου έχει αναφερθεί στα θαλασσινά είδη ευρωπαϊκό λαβράκι (Le Breton *et al.*, 1997· Castric *et al.*, 2001), sevenband grouper (Gomez *et al.*, 2004), ασιατικό λαβράκι (Paramerswaran *et al.*, 2008) και atlantic halibut (Nerland *et al.* 2007), όπου πηγές του ιού θεωρήθηκαν είτε νοσούντα ψάρια, είτε μολυσμένα με τον ιό νερά.

Η δυνατότητα οριζόντιας μετάδοσης έχει αναφερθεί σε πληθώρα πειραματικών δοκιμών με εμβάπτιση του ιού στο νερό ή συμβίωση υγιών με νοσούντα ψάρια, στα είδη κοκάλι, *Pseudocaranx dentex* (Arimoto *et al.*, 1993), ευρωπαϊκό λαβράκι, *Dicentrarchus labrax* (Péducasse *et al.*, 1999· Skliris and Richards 1999), ασιατικό λαβράκι, *Lates calcarifer* (Manin and Rasangan, 2011) και τσιπούρα, *Sparus aurata* (Castric *et al.*, 2001, Aranguren *et al.*, 2002). Η τσιπούρα μάλιστα συγκαταλέγεται στους ασυμπτωματικούς φορείς του ιού, καθώς οι Castric και συνεργάτες (2001) ανέφεραν ανίχνευση του ιού σε λαβράκια 9 μέρες μετά τη συμβίωση με ασυμπτωματικά μολυσμένες τσιπούρες. Οριζόντια μετάδοση του ιού έχει παρατηρηθεί και σε ψάρια του γλυκού νερού, συμπεριλαμβανομένου του ευρωπαϊκού χελιού μετά από συμβίωση με ασυμπτωματικά μολυσμένα ασιατικά λαβράκια (Chi *et al.*, 2003), και του είδους *Salaria fluviatilis* (Vendramin *et al.*, 2012). Η υποκλινική λοίμωξη φαίνεται ότι διευκολύνει την οριζόντια και κάθετη μετάδοση του ιού (Castric *et al.*, 2001· Breuil *et al.* 2002).

Η ιχθυοπυκνότητα (Arimoto *et al.*, 1993), η λοιμογόνος δύναμη του ιικού στελέχους, η ηλικία των ψαριών (Aranguren *et al.*, 2002· Arimoto *et al.*, 1993), η θερμοκρασία του νερού (Tanaka *et al.*, 1998) και η ανθεκτικότητα του ιού σε περιβαλλοντικούς παράγοντες

όπως το pH και η θερμοκρασία (Frerichs *et al.*, 1996· Frerichs *et al.*, 2000) αποτελούν παράγοντες που επηρεάζουν την οριζόντια μετάδοση από ασθενή σε υγιή ψάρια.

Εκτός των νοσούντων και υποκλινικά μολυσμένων ψαριών, ο ιός μπορεί να μεταδοθεί και μέσω μολυσμένων τροφών και μολυσμένου νερού το οποίο προέρχεται από γειτονικές μολυσμένες εκτροφές ή μολυσμένες πηγές υδροδότησης (Chi *et al.*, 2000· Vendramin *et al.*, 2012).

1.2.2 Κάθετη μετάδοση

Η έναρξη κλινικών συμπτωμάτων σε πολύ πρώιμα στάδια ανάπτυξης, σε συνδυασμό με την ανίχνευση του γενώματος Betanoda-ιών στο αναπαραγωγικό σύστημα γεννητόρων, σε αυγά και προνύμφες, αποτέλεσαν για αρκετούς συγγραφείς ενδείξεις κάθετης μετάδοσης της νόσου (Arimoto *et al.*, 1992· Mushiake *et al.*, 1994· Nishizawa *et al.*, 1996· Dalla Valle *et al.*, 2000). Μεταξύ των ειδών στα οποία έχει αναφερθεί κάθετη μετάδοση Betanoda-ιών συγκαταλέγονται το κοκάλι, *Pseudocaranx dentex* (Arimoto *et al.*, 1992· Mushiake *et al.*, 1994· Nishizawa *et al.*, 1996· Nguyen *et al.*, 1997), το ευρωπαϊκό λαβράκι, *Dicentrarchus labrax* (Peducasse *et al.*, 1999· Breuil *et al.*, 2002), το ασιατικό λαβράκι, *Lates calcarifer* (Comps *et al.*, 1994· Azad *et al.*, 2006) και το ψάρι barfin flounder, *Verasper moseri* (Watanabe *et al.*, 2000).

Σε γενικές γραμμές, η κάθετη μετάδοση ενός παθογόνου παράγοντα καθίσταται εφικτή είτε μέσω της ωοθήκης, όπου ο παθογόνος παράγοντας ανευρίσκεται εντός του αυγού, είτε με επιμόλυνση της επιφάνειας του αυγού. Ο διαχωρισμός ωστόσο του τρόπου κάθετης μετάδοσης έχει ιδιαίτερη σημασία στις υδατοκαλλιέργειες, καθώς η απολύμανση των αυγών είναι αποτελεσματική μόνο στην περίπτωση που ο παθογόνος παράγοντας ανευρίσκεται στην επιφάνεια του αυγού. Όσον αφορά στους Betanoda-ιούς, η απολύμανση της επιφάνειας των γονιμοποιημένων αυγών με όζον έχει δείξει ότι

αποτρέπει τη μετάδοση του ιού σε προνύμφες atlantic halibut (Grotmol and Totland, 2000). Ωστόσο δεν έχει καταστεί εφικτός ο προσδιορισμός της οδού κάθετης μετάδοσης, παρόλο που ο ιός έχει ανιχνευθεί τόσο στο συνδετικό ιστό ωοθηκών ασιατικού λαβρακιού, όσο και σε αυγά και προνύμφες του ίδιου είδους με τη μέθοδο της ανοσοϊστοχημείας (Azad *et al.*, 2006).

Οι μολυσμένοι γεννήτορες συνήθως δεν εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα κι έτσι ο χρόνος μόλυνσής τους δεν είναι γνωστός. Ο ιός πιθανά δεν πολλαπλασιάζεται συνεχώς και μπορεί να μην εντοπίζεται πάντα στα αναπαραγωγικά όργανα, αλλά κυρίως σε περιόδους έντονης καταπόνησης των γεννητόρων (Mushiake *et al.*, 1994), όπως για παράδειγμα όταν χρησιμοποιείται ο ίδιος γεννήτορας σε πολλές και επαναλαμβανόμενες ωοτοκίες (Munday *et al.*, 2002). Επιπροσθέτως, η συγκέντρωση του ιού στις γονάδες των γεννητόρων φορέων πιθανά είναι πολύ μικρή.

1.2.3 Είσοδος και πολλαπλασιασμός του ιού στον οργανισμό

Η διαδικασία πολλαπλασιασμού ενός Noda-ιού περιλαμβάνει διαδοχικά στάδια. Αρχικά, ο ιός εισέρχεται στο κύτταρο του ξενιστή πιθανά με ενδοκυττάρωση (Liu *et al.*, 2005), απεκδύεται και απελευθερώνει το ιικό RNA στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, το RNA-1 γενωμικό τμήμα μεταφράζεται και παράγεται η πρωτεΐνη-ένζυμο RdRp. Με τη βοήθεια του ενζύμου RdRp συντίθεται συμπληρωματικές μονόκλωνες RNA αλυσίδες αρνητικής πολικότητας, οι οποίες λειτουργούν ως πρότυπο για την παραγωγή νέων θετικής πολικότητας μονόκλωνων RNA αλυσίδων, ενώ εκφράζεται και το υπογενωμικό RNA3. Η μετάφραση του RNA2 οδηγεί στην παραγωγή καψιδιακής πρωτεΐνης α. Το ιοσωμάτιο συγκροτείται στο κυτταρόπλασμα γύρω από τα RNA1 και RNA2 γενωμικά τμήματα και η καψιδιακή πρωτεΐνη α διασπάται σε καψιδιακή πρωτεΐνη β και γ. Τελικά, τα ώριμα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται, προκαλώντας τη λύση του κυττάρου (viral zone). Κατά τη διαδικασία της αντιγραφής, τα RNA1 και RNA2 γενωμικά τμήματα,

συντίθενται σε περίπου ίσες ποσότητες, ενώ το υπογενωμικό RNA3 μόνο κατά τα τελευταία στάδια της αντιγραφής (Friesen and Rueckert 1984· Ball, 1992). Στις κύριες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των Noda-ιών περιλαμβάνονται η πρωτεΐνη A (που κωδικοποιείται από το RNA1), η πρωτεΐνη B1 και B2 (που κωδικοποιούνται από το RNA3) και η πρωτεΐνη α (που κωδικοποιείται από το RNA2).

1.2.4 Ανοσολογική απόκριση έναντι *Betanoda*-ιών

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στη μελέτη των μηχανισμών που υπεισέρχονται στην ανοσολογική απόκριση των ψαριών έναντι των *Betanoda*-ιών. Σύμφωνα με αυτές, τα λειτουργικά συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών έχουν τη δυνατότητα να σχηματίσουν μια εξαιρετικά οργανωμένη άμυνα ενάντια σε μόλυνση από *Betanoda*-ιούς.

Οι κυτταροκίνες των ψαριών είναι μόρια που ρυθμίζουν τις ανοσολογικές αποκρίσεις και εμπλέκονται στην επαγωγή της έμφυτης ανοσίας, στη δημιουργία κυτταροτοξικών T-κυττάρων και την παραγωγή αντισωμάτων (Reyes-Cepeda *et al.*, 2012). Περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα μορίων, όπως η ιντερφερόνη (IFN), οι ιντερλευκίνες (IL-1) ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF) που μπορούν να λειτουργήσουν είτε ως ενεργοποιητές είτε ως καταστολείς της δραστηριότητας του ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι ιντερφερόνες (IFN) είναι οι κύριες κυτταροκίνες που επάγουν αντιική ανοσολογική απόκριση (Robertsen, 2006). Σε λοιμώξεις από *Betanoda*-ιούς έχουν αναφερθεί η έκφραση και των δύο τύπων, IFN I και IFN II, σε atlantic halibut και καλκάνι, *Scophthalmus maximus*, αντίστοιχα (Overgard *et al.*, 2012a· Montes, Figueras and Novoa, 2010). Σε μία *in vitro* μελέτη ενοφθαλμισμού του RGNNV στη κυτταρική σειρά GB, παρατηρήθηκε υπερέκφραση του ρυθμιστικού παράγοντα ιντερφερόνης 3 (IRF3),

αύξηση της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με IFN και μείωση της αντιγραφής του ιού στα μολυσμένα κύτταρα (Huang *et al.*, 2015a).

Η πρωτεΐνη Mx, που επάγεται από την ομάδα I της IFN τύπου I, είναι μία αντιική πρωτεΐνη που φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση της λοίμωξης από Betanoda-ιούς (Lin *et al.*, 2006), καθώς συντελεί στη μείωση του ιικού πολλαπλασιασμού. Επαγωγή της πρωτεΐνης Mx έχει αναφερθεί σε αρκετά είδη, όπως το ευρωπαϊκό λαβράκι, η τσιπούρα, το καλκάνι και η σφυρίδα (Montes, Figueras and Novoa, 2010· Scapigliati *et al.*, 2010· Chen *et al.*, 2008· Poisa-Beiro *et al.*, 2008). Επαγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως οι IL-1b, IL-6 και TNFa έναντι λοιμώξεων από Betanoda-ιούς έχει αναφερθεί σε atlantic halibut, ευρωπαϊκό λαβράκι και καλκάνι (Overgard *et al.*, 2012a,b· Scapigliati *et al.*, 2010· Poisa-Beiro *et al.*, 2008· Dios *et al.*, 2007).

Η παραγωγή αντισωμάτων αποτελεί σημαντικό μηχανισμό άμυνας έναντι των λοιμώξεων από Betanoda-ιούς (Chen, Wang and Chen, 2014). Έχει διαπιστωθεί υπερέκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την IgM (Scapigliati *et al.*, 2010) καθώς και παρουσία ειδικών αντισωμάτων έναντι του ιού σε ευρωπαϊκό και ασιατικό λαβράκι, κοκάλι, σφυρίδα και atlantic halibut (Grove *et al.*, 2006· Scapigliati *et al.*, 2010· Mushiake *et al.*, 1992· Breuil and Romestad, 1999· Jaramillo *et al.*, 2016· Tanaka *et al.*, 2001· Pakingking *et al.*, 2009· Yamashita *et al.*, 2009). Τα παραγόμενα αντισώματα στοχεύουν σε συγκεκριμένες περιοχές της καψιδιακής πρωτεΐνης του ιού (CP), που εντοπίζονται στο N-άκρο, στο C-άκρο και μεταξύ των 91 έως 162, 180 έως 212 και 254 έως 256 αμινοξέων (Coeurdacier *et al.*, 2003· Costa *et al.*, 2007· Nishizawa *et al.*, 1999· Chen C.W. *et al.*, 2015).

Αρκετοί ερευνητές αναφέρουν ότι η λοίμωξη από Betanoda-ιούς οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των T-κυττάρων στα ψάρια όπως και σε έκφραση αρκετών γονιδίων που σχετίζονται με τα T-κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα (CTL) (Chang *et al.*, 2011a· Chang

et al., 2011b; Scapigliati *et al.*, 2010; Chaves-Pozo *et al.*, 2012). Αύξηση της έκφρασης γονιδίων T-κυττάρων (TRCb, CD4-2, CD4, CD8a, CB8b, Lck, NCCRP-1 and ZAP-70) έχει αναφερθεί σε atlantic halibut, ευρωπαϊκό λαβράκι και τσιπούρα μετά από μόλυνση με Betanoda-ιούς (Øvergård *et al.*, 2012a; Scapigliati *et al.*, 2010; Chaves-Pozo *et al.*, 2012). Επιπλέον, σημαντική γονιδιακή έκφραση των IL-1β, Mx, MHC-I, MHC-II, CD8α, IgM και IgT, παρατηρήθηκε μετά από ανοσοποίηση προνυμφών *Epinephelus coioides* με αδρανοποιημένο NNV, με τη μέθοδο της εμφάνισης και μέσω του στόματος (Kai, Wu and Chi, 2014).

1.3 Η ΙΟΓΕΝΗΣ ΕΓΚΕΦΑΛΟΠΑΘΕΙΑ ΚΑΙ ΑΜΦΙΒΛΗΣΤΡΟΕΙΔΟΠΑΘΕΙΑ (VIRAL ENCEPHALOPATHY AND RETINOPATHY, VER)

Με τον όρο «ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια (Viral Encephalopathy and Retinopathy, VER) των ψαριών» περιγράφεται η νοσολογική κατάσταση που οφείλεται στη μόλυνση των ψαριών από Betanoda-ιούς. Η νόσος αναφέρεται επίσης και ως Ιογενής Νευρική Νέκρωση (Viral Nervous Necrosis, VNN) (Yoshikoshi and Inoue, 1990), Εγκεφαλομυελίτιδα (Bloch *et al.*, 1991) και Κενοτοπιώδης Εγκεφαλοπάθεια και Αμφιβληστροειδοπάθεια (Vacuolating Encephalopathy and Retinopathy, VER) (Munday *et al.*, 1992· OIE, 2016).

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της νόσου είναι η εμφάνιση νευρικών συμπτωμάτων στα προσβεβλημένα ψάρια ως αποτέλεσμα της προσβολής του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Κ.Ν.Σ.) και του αμφιβληστροειδούς χιτώνα του οφθαλμού. Αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στις υδατοκαλλιέργειες, κυρίως στην εκτροφή λαβρακιού, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλες απώλειες προνυμφών αλλά και ψαριών μεγαλύτερου μεγέθους.

Η νόσος περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Glazebrook και Campbell (1987) στο είδος *Lates calcarifer* (Barramundi) στην Αυστραλία. Το 1990, ένας εικοσαεδρικής συμμετρίας ιός, διαμέτρου 34 nm, θεωρήθηκε αιτιολογικός παράγοντας της νόσου σε ιαπωνικό ψάρι παπαγάλο (*Oplegnathus fasciatus*) (Yoshikoshi and Inoue, 1990). Το 1992, ο ιός SJNNV που οδήγησε στην εκδήλωση εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας σε κοκάλι στην Ιαπωνία θεωρήθηκε νέο μέλος της οικογένειας Nodaviridae (Mori *et al.*, 1992). Έκτοτε, η νόσος έχει αναφερθεί σε πολλά εκτρεφόμενα και άγρια είδη τόσο του θαλασσινού όσο και του γλυκού νερού.

Στην Ελλάδα εμφανίστηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του '90 και έκτοτε προκαλεί περιοδικά κρούσματα σε άγριους και εκτρεφόμενους ιχθυοπληθυσμούς. Στα ψάρια της ανοικτής θάλασσας εκδηλώνεται συνήθως περί τα μέσα του φθινοπώρου, όταν η θερμοκρασία των υδάτων βρίσκεται στα υψηλότερα επίπεδα.

1.3.1 Παθογένεια της νόσου

Οι Betanoda-ιοί είναι νευροτρόποι ιοί. Ο εγκέφαλος και ο αμφιβληστροειδής χιτώνας του οφθαλμού έχουν θεωρηθεί ως οι κύριοι ιστοί – στόχοι όπου κυρίως εντοπίζεται η κυτταροπαθογόνος δράση τους. Αναφορικά με την πύλη εισόδου του ιού στον οργανισμό του ξενιστή έχουν διατυπωθεί διαφορετικές υποθέσεις, στηριγμένες στον εντοπισμό ανοσοθετικών κυττάρων ή ιικού γενώματος σε διαφορετικούς ιστούς - όργανα προσβεβλημένων ψαριών. Το δέρμα, ο γαστρεντερικός σωλήνας, το οσφρητικό επιθήλιο και τα βράγχια έχουν θεωρηθεί ιστοί μέσω των οποίων ο ιός εισέρχεται στον οργανισμό των ξενιστών του (Nguyen *et al.*, 1996· Grotmol *et al.*, 1999· Peducasse *et al.*, 1999· Mladineo, 2003· Banu *et al.*, 2004· Tanaka *et al.*, 2004· Azad *et al.*, 2006). Αντίστοιχα, όσον αφορά στην εξάπλωση του ιού μετά την είσοδό του στον οργανισμό, έχει διατυπωθεί ότι επιτυγχάνεται είτε νευρογενώς, είτε αιματογενώς (Nguyen *et al.*, 1996· Grotmol *et al.*, 1999· Husgaro *et al.*, 2001). Σε πρόσφατη διδακτορική διατριβή που εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ιχθυολογίας – Ιχθυοπαθολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής Π.Θ, διαπιστώθηκε ότι ο ιός RGNNV δύναται να εισέλθει στον οργανισμό ευρωπαϊκού λαβρακιού μέσω διαφορετικών ιστών – διόδων (επιπεφυκότας, βράγχια, πλευρική γραμμή, γαστρεντερικός σωλήνας) στους οποίους ενοφθαλμίστηκε (Λάμπου, 2017). Επιπλέον, σε όλες τις οδούς χορήγησης, η εξάπλωση του ιού στον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού επιτεύχθηκε νευρογενώς, ενώ ιαιμία

εκδηλώθηκε μόνο μετά την εγκατάσταση της μόλυνσης στον εγκεφαλο και ενώ ο ιός είχε ήδη ανιχνευθεί σε νευρικούς ιστούς (Λάμπου, 2017).

Μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τη διασπορά του ιού στους ιστούς των ψαριών έχουν δείξει ότι μπορεί να ανιχνευθεί και σε μη-νευρικούς ιστούς όπως οι μύες (Nguyen *et al.*, 1996· Ararungen *et al.*, 2002· Su *et al.*, 2015a), ο νεφρός (Husgaro *et al.*, 2001· Su *et al.*, 2015a), το ήπαρ (Mladineo, 2003· Lopez-Jimena *et al.*, 2012· Su *et al.*, 2015a), το ουραίο περύγιο (Mazelet *et al.*, 2011· Lopez-Jimena *et al.*, 2011), ο σπλήνας (Lopez-Jimena *et al.*, 2012· Su *et al.*, 2015a), η καρδιά (Su *et al.*, 2015a) και το αίμα (Dalla Valle *et al.*, 2000· Oliveira *et al.*, 2008· Korsnes *et al.*, 2009· Lopez-Jimena *et al.*, 2010). Η συστηματική κατανομή του ιού υποδηλώνει ότι ο ιός πολλαπλασιάζεται και σε άλλους τύπους κυττάρων εκτός των νευρικών κυττάρων. Ωστόσο ο πολλαπλασιασμός του ιικού γενώματος στους ιστούς αυτούς φαίνεται να μην οδηγεί σε παραγωγική μόλυνση, πιθανά λόγω κάποιας ανεπιτυχούς διαδικασίας που λαμβάνει χώρα κατά τα τελευταία στάδια του ιικού κύκλου σε αυτά τα κύτταρα, όπως η ωρίμανση των ιοσωματίων (Lopez-Jimena *et al.*, 2011).

1.3.2 Κλινική εικόνα της νόσου

Η κλινική εικόνα της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας των ψαριών σχετίζεται με τις αλλοιώσεις που προκαλούν οι Betanoda-ιοί στα κύτταρα του Κ.Ν.Σ. και του οφθαλμού. Σε γενικές γραμμές, παρατηρούνται ανορεξία, λήθαργος, κινητικές ανωμαλίες, απώλεια ελέγχου της νηκτικής κύστης, δυσκολία στην όραση και σκούρος χρωματισμός του δέρματος (Munday *et al.*, 2002). Οι κινητικές ανωμαλίες χαρακτηρίζονται από σπειροειδή κολύμβηση, κυκλική κολύμβηση, απότομη προς τα εμπρός κίνηση, υπερκινητικότητα μετά από ενόχληση, κάμψη του σώματος και ληθαργική συμπεριφορά είτε στην επιφάνεια, είτε στον πυθμένα του

δίχτυού. Έχει παρατηρηθεί επιπλέον στάση με την κοιλιακή χώρα προς τα άνω, καθώς και κάθετη στάση με το κεφάλι ή το ουραίο πτερύγιο κάτω από την επιφάνεια του νερού (Glazebrook *et al.*, 1990¹ Yoshikoshi and Inoue, 1990² Bloch *et al.*, 1991³ Breuil *et al.*, 1991⁴ Mori *et al.*, 1991⁵ Mori *et al.*, 1992⁶ Grotmol *et al.*, 1997a⁷ Bovo *et al.*, 1999). Όσον αφορά στη νηκτική κύστη, έχει αναφερθεί διόγκωσή της στο ασιατικό και το ευρωπαϊκό λαβράκι και στο κοκάλι που οδηγεί σε προβλήματα πνευστότητας (Breuil *et al.*, 1991⁴ Mori *et al.*, 1992⁶). Το δέρμα εμφανίζει σκούρο χρωματισμό στα περισσότερα είδη ψαριών. Ωστόσο οι προνύμφες του ασιατικού λαβρακιού και του atlantic halibut γίνονται πιο ωχρές (Glazebrook *et al.*, 1990¹ Grotmol *et al.*, 1997a⁷). Λόγω των διαταραχών στην όραση πολλά ψάρια παρουσιάζουν εξελκώσεις στο πρόσθιο τμήμα του ρύγχους ως συνέπεια της κρούσης τους στα δίχτυα. Μπορεί επιπλέον να παρατηρηθεί απίσχναση των προσβεβλημένων ψαριών λόγω της προκαλούμενης ανορεξίας. Το κυριότερο σύμπτωμα που παρατηρείται κατά την περίοδο έξαρσης του νοσήματος είναι οι μαζικοί θάνατοι, ειδικά στις προνύμφες (Munday and Nakai, 1997).

Η σφοδρότητα των κλινικών συμπτωμάτων και το μέγεθος της θνησιμότητας εξαρτώνται από την ηλικία του ψαριού και τη θερμοκρασία των υδάτων. Γενικότερα, όσο πιο μικρά προσβάλλονται τα ψάρια, τόσο μεγαλύτερα είναι τα ποσοστά θνησιμότητας, ενώ εντονότερα καθίστανται και τα κλινικά συμπτώματα. Έτσι, οι απώλειες είναι πολύ μεγάλες όταν τα ψάρια προσβάλλονται στο στάδιο της προνύμφης ή σε νεαρά στάδια ανάπτυξης. Σημαντικές απώλειες ωστόσο, έχουν αναφερθεί και σε μεγαλύτερης ηλικίας ψάρια, ειδικά σε είδη του γένους *Epinephelus* (Fukuda *et al.*, 1996), σε λαβράκι (Le Breton *et al.*, 1997), και σε atlantic halibut (Aspehaug *et al.*, 1999). Η θερμοκρασία είναι παράγοντας που παίζει καθοριστικό ρόλο στην εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων (ΟΙΕ, 2016). Υψηλότερη θνησιμότητα και νωρίτερη εμφάνιση της ασθένειας παρατηρήθηκε σε υψηλότερες θερμοκρασίες, ενώ θερμοκρασίες νερού άνω των 31°C ανέστειλαν τον

πολλαπλασιασμό του RGNNV σε humpback grouper (*Chromileptes altivelis*) (Yuasa *et al.*, 2007). Στην υψηλή θερμοκρασία των υδάτων αποδόθηκαν τα έντονα κλινικά συμπτώματα άγριων πληθυσμών των ειδών *Epinephelus marginatus*, *Epinephelus costae* και *Dicentrarchus labrax* κατά τη διάρκεια επιζωοτίας της νόσου στις βόρειες ακτές της Ιταλίας το καλοκαίρι του 2011 (Vendramin *et al.*, 2013). Οι υψηλές θερμοκρασίες φαίνεται να σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου στα εμπορικού μεγέθους ψάρια (Le Breton *et al.*, 1997· Tanaka *et al.*, 1998). Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα πειραματικών μολύνσεων σε λαβράκι και γλώσσα, ο γενότυπος του ιού και η περιοχή προέλευσης του πιθανά επιδρούν στην εκδήλωση και την ένταση των κλινικών συμπτωμάτων όπως επίσης και στο μέγεθος της θνησιμότητας (Breuil *et al.*, 2001· Souto *et al.*, 2015).

1.3.3 Υποκλινική μόλυνση

Η υποκλινική λοίμωξη από ιούς του γένους *Betanodavirus* χαρακτηρίζεται από παρουσία του ιού στα ψάρια, χωρίς εκδήλωση της νόσου και μπορεί να οδηγήσει σε κάθετη και οριζόντια μετάδοση του ιού (Castric *et al.* 2001· Breuil *et al.* 2002· Gomez *et al.*, 2004). Η κάθετη μετάδοση από υποκλινικά μολυσμένους γεννήτορες θεωρείται ως ένας από τους κύριους τρόπους μετάδοσης του ιού στα εκτρεφόμενα ψάρια (Breuil *et al.*, 2002). Πιθανοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην εκδήλωση υποκλινικής μόλυνσης είναι ο εγκλωβισμός του ιού ή ο χαμηλός ιικός πολλαπλασιασμός υπό την επίδραση της ιντερφερόνης στους ιστούς του ξενιστή (Chi, Wu and Cheng 2005). Μεταξύ των παραγόντων που μπορούν να επιδράσουν στη μετατροπή μιας υποκλινικής μόλυνσης σε οξεία, συγκαταλέγονται βιολογικοί και περιβαλλοντικοί στρεσογόνοι παράγοντες, όπως διαταραχές στη σίτιση (Johansen *et al.*, 2004), επαναλαμβανόμενες ωοτοκίες (Mushiake *et al.* 1993), υψηλές

θερμοκρασίες νερού (Chi, Shieh and Lin, 2003) και αυξημένα επίπεδα CO₂ και PO₄ (Athanassopoulou, Billinis and Prapas, 2004).

Επίμονη, υποκλινική λοίμωξη από Betanoda-ιούς έχει αναφερθεί σε γεννήτορες κοκαλιού (Arimoto *et al.*, 2001), σε ασυμπτωματικές τσιπούρες που εκτρέφονταν δίπλα σε λαβράκια με έντονα κλινικά συμπτώματα της νόσου (Castric *et al.*, 2001), σε προνύμφες atlantic halibut (Johansen *et al.*, 2002), σε spotted wolffish (*Anarhichas minor*) που είχαν επιβιώσει από πειραματική μόλυνση με Betanoda-ιούς (Johansen *et al.*, 2004). Το 2004 οι Gomez και συνεργάτες ανίχνευσαν τον ιό με RT-PCR και ένθετη RT-PCR σε 27 είδη υποκλινικά μολυσμένων εκτρεφόμενων και άγριων ψαριών. Υποκλινική μόλυνση έχει επίσης διαπιστωθεί στο εκτρεφόμενο είδος atlantic cod (*Gadus morhua*) (Nylund *et al.*, 2008· Gjessing *et al.*, 2009), σε εκτρεφόμενο barramundi (*Lates calcarifer*) (Hick *et al.*, 2011) και σε είδη άγριων πληθυσμών σε όλο τον κόσμο (Munday *et al.*, 2002· Gomez *et al.*, 2006· Nylund *et al.*, 2008).

Η βελτίωση της ευαισθησίας των διαγνωστικών τεχνικών ανίχνευσης του ιού είναι καθοριστικός παράγοντας για την ταυτοποίηση υποκλινικής λοίμωξης, καθώς τόσο η ποσότητα του ιού όσο και ο επιπολασμός της μόλυνσης μπορεί να είναι χαμηλός (Nylund *et al.*, 2008).

1.3.4 Παθολογοανατομικές αλλοιώσεις

Κύριο παθολογοανατομικό εύρημα της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας, παθογνωμονικό της νόσου, είναι η παρουσία κενотоπιώδους εκφύλισης στο Κ.Ν.Σ. και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού. Οι όροι «ιογενής νευρική νέκρωση» και «ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια» που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή της νόσου,

σχετίζονται με τις παρατηρούμενες παθολογοανατομικές αλλοιώσεις. Σε γενικές γραμμές, ο πρόσθιος εγκέφαλος είναι εντονότερα προσβεβλημένος σε σχέση με τον οπίσθιο εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό (Munday *et al.*, 2002). Επιπλέον, στα μικρότερης ηλικίας ψάρια οι αλλοιώσεις είναι πιο έντονες, ενώ στα μεγαλύτερης ηλικίας οι αλλοιώσεις είναι λιγότερο εκτεταμένες και εντοπίζονται συνήθως στον αμφιβληστροειδή (Munday *et al.*, 2002).

Αρκετοί ερευνητές έχουν περιγράψει λεπτομερώς την παθολογοανατομική εικόνα της νόσου. Η πιο χαρακτηριστική αλλοίωση που παρατηρείται στον εγκέφαλο των νοσούντων ψαριών είναι η παρουσία κενотоπιών στη φαιά ουσία (Nguyen *et al.*, 1996· Munday *et al.*, 2002), όπου επίσης ανευρίσκονται νεκρωμένα κύτταρα με πυκνωτικούς πυρήνες (Azad *et al.*, 2006). Κενотоπίωδης εκφύλιση έχει αναφερθεί στον οπτικό λοβό προνυμφών και νεαρών ψαριών atlantic halibut (Grotmol *et al.*, 1997a), στον οσφρητικό λοβό ατόμων sevenband grouper (Tanaka *et al.*, 2004), στη στιβάδα κυττάρων Purkinje και στην κοκκιώδη κυτταρική στιβάδα της παρεγκεφαλίδας (Tanaka *et al.*, 2004), στη μοριώδη κυτταρική στιβάδα της παρεγκεφαλίδας λαβρακιών (Mladineo, 2003). Οι περιοχές με έντονη κενотоπίωση προσδίδουν σπογγώδη εμφάνιση στον ιστό και σε ορισμένες περιπτώσεις διηθούνται από μακροφάγα (Tanaka *et al.*, 2004).

Κενотоπίωση έχει αναφερθεί και στους νευρώνες κεφαλικών και νωτιαίων γαγγλίων σε atlantic halibut και ιαπωνικό ψάρι παπαγάλο (Grotmol *et al.*, 1997a· Yoshikoshi and Inoue, 1990), ενώ ο νωτιαίος μυελός ήταν η πρώτη περιοχή που εμφάνισε αλλοιώσεις σε κοκάλι (Grotmol *et al.*, 1999).

Στις εκφυλιστικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στα κύτταρα του Κ.Ν.Σ. και του αμφιβληστροειδή έχουν περιληφθεί η πύκνωση, η συρρίκνωση, η βασηοφιλία και η λύση των κυττάρων καθώς και η καρυορρηξία των πυρήνων. Η κυτταρική λύση λαμβάνει χώρα πιο συχνά και σχετίζεται με την κενотоπίωση, και η κυτταρική

πύκνωση αφορά στη συσσώρευση ιοσωματίων στο κυτταρόπλασμα κυττάρων που περιέχουν λίγα εκφυλισμένα μιτοχόνδρια (Yoshikoshi and Inoue, 1990).

Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί κοκκίωση του νευροπιλήματος, παρουσία διηθήσεων από μονοπύρρηνα κύτταρα (Grotmol *et al.*, 1995), παρουσία εωσινοφιλικού και PAS (Periodic Acid-Schiff) θετικού υλικού στο τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων του εγκεφάλου (Munday *et al.*, 1992), καθώς και οίδημα του ενδοθηλίου αυτών (Le Breton *et al.*, 1997). Διογκωμένα, σφαιρικά, βασεόφιλα κύτταρα, μαζί με κύτταρα που περιέχουν έγκλειστα και κυτταροπλασματικά κενοτόπια έχουν περιγραφεί στον οπτικό λοβό, την παρεγκεφαλίδα, τον προμήκη μυελό και το νωτιαίο μυελό προσβεβλημένων προνυμφών ασιατικού λαβρακιού (Renault *et al.*, 1991). Βασεόφιλα ενδοκυτταροπλασματικά έγκλειστα έχουν επίσης ανευρεθεί στα εγκεφαλικά κύτταρα, στο ιαπωνικό ψάρι παπαγάλος, στο ασιατικό και το ευρωπαϊκό λαβράκι και στη στήρα μαλαμπάρ (Yoshikoshi and Inoue, 1990· Glazebrook *et al.*, 1990· Breuil *et al.*, 1991· Boonyaratpalin *et al.*, 1996). Εστιακά συσσωματώματα κυττάρων τύπου μακροφάγων, που περιείχαν ιικά σωματίδια και βρίσκονταν διασκορπισμένα στον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή έχουν αναφερθεί σε επίμονα μολυσμένα, αλλά ασυμπτωματικά νεαρά atlantic halibut (Nilsen *et al.*, 2001).

Στον αμφιβληστροειδή χιτώνα του οφθαλμού έχει περιγραφεί κενοτοπίωση στα διπολικά κύτταρα της εσωτερικής και εξωτερικής πυρηνικής στιβάδας, στη γαγγλιωνική κυτταρική στοιβάδα (Munday *et al.*, 1992· Tanaka *et al.*, 2004· Zorriehzahra *et al.*, 2014), και στη στοιβάδα των ραβδίων και των κωνίων (Grotmol *et al.*, 1995). Σε εμπορικού μεγέθους σολομούς του Ατλαντικού που εμφάνιζαν αλλοιώσεις μυοκαρδίτιδας και περικαρδίτιδας, ανευρέθηκαν ιικά σωματίδια Noda-ιών στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ενδοκαρδίου, στα μυϊκά κύτταρα και στα μεσοθηλιακά κύτταρα του επικάρδιου μετά από ηλεκτρονική μικροσκοπήση και ανοσοϊστοχημεία (Grotmol *et al.*, 1997b).

1.3.5 Διάγνωση

1.3.5.1 Κλινική εικόνα

Η κλινική εικόνα των νοσούντων ψαριών, που χαρακτηρίζεται από διαταραχές στη κολύμβηση, θέτει υποψία ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας. Συνήθως, δεν παρατηρούνται αλλοιώσεις στην εξωτερική επιφάνεια του σώματος και στα βράγχια, παρά μόνο σκούρος χρωματισμός του δέρματος σε ορισμένα είδη (ΟΙΕ, 2016). Στο ευρωπαϊκό λαβράκι ωστόσο, έχει αναφερθεί η ύπαρξη διαβρώσεων και ελκών στην κάτω γνάθο και γενικά στην περιοχή της κεφαλής, πιθανά λόγω τραυματισμών εξαιτίας διαταραχών στην όραση (ΟΙΕ, 2016). Εκτός των διαταραχών στη συμπεριφορά, η κλινική διάγνωση στηρίζεται στην εποχικότητα της νόσου (καλοκαίρι και φθινόπωρο, όταν η θερμοκρασία του νερού αυξάνεται) και στις παθολογοανατομικές αλλοιώσεις, με παθολογική την ύπαρξη κενотоπιώδους εκφύλισης στον εγκέφαλο και τον αμφιβληστροειδή των νοσούντων ψαριών. Παραταύτα, για την ταυτοποίηση του αιτιολογικού παράγοντα είναι απαραίτητη η διεξαγωγή εργαστηριακών εξετάσεων.

1.3.5.2 Εργαστηριακή διάγνωση

Η εργαστηριακή διάγνωση περιλαμβάνει μεθόδους που στοχεύουν στην ανίχνευση του ιού και ορολογικές μεθόδους που στοχεύουν στην ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι Betanoda-ιών. Οι μέθοδοι ανίχνευσης του ιού περιλαμβάνουν την ανίχνευση των ιικών αντιγόνων με ανοσοφθορισμό (IFAT), ανοσοϊστοχημεία (IHC) και ELISA, την απομόνωση αυτού σε κυτταροκαλλιέργειες, την ανεύρεση ιικών σωματιδίων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και την ανίχνευση του ιικού γενώματος με μοριακές τεχνικές.

1.3.5.2.1 Ανοσοφθορισμός (IFAT)

Η μέθοδος του ανοσοφθορισμού (Indirect Fluorescent Antibody Test, IFAT) εφαρμόζεται σε νωπά επιχρίσματα εγκεφάλου, σε τομές ιστών διατηρημένων στην κατάψυξη και σε τομές ιστών μετά από αποπαραφίνωση, με τη χρήση μονοκλωνικών ή πολυκλωνικών αντισωμάτων (Grotmol *et al.*, 1999; Iwamoto *et al.*, 1999). Στην περίπτωση εφαρμογής της μεθόδου σε νωπά επιχρίσματα, προτείνεται λήψη τους μόνο από ψάρια με κλινική συμπτωματολογία, λόγω αδιευκρίνιστης ευαισθησίας της μεθόδου (ΟΙΕ, 2016). Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγεται το ότι είναι γρήγορη και οικονομική καθώς και το ότι ο πολυκλωνικός αντιορός που χρησιμοποιείται ως αντίσωμα, έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει όλα τα έως τώρα γνωστά στελέχη του γένους *Betanodavirus* (Shetty *et al.*, 2012). Μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η χρήση μεγαλύτερης ποσότητας ιστού και η χαμηλότερη ευαισθησία σε σχέση με την ELISA (Shetty *et al.*, 2012).

1.3.5.2.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Η ELISA είναι μια διαγνωστική μέθοδος που έχει τη δυνατότητα γρήγορης και εύκολης εφαρμογής σε μεγάλο αριθμό και ποικιλία βιολογικών δειγμάτων. Είναι πιο ευαίσθητη από τον ανοσοφθορισμό, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει πολύ μικρές ποσότητες ιού. Έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση Betanoda-ιών σε κοκάλι, *Pseudocaranx dentex* (Arimoto *et al.*, 1992), σε ευρωπαϊκό λαβράκι, *Dicentrarchus labrax* (Breuil *et al.*, 2001; Nunez-Ortiz *et al.*, 2015), σε γιγαντιαία γαρίδα του γλυκού νερού, *Macrobrachium rosenbergii* (Romestand and Bonami, 2003) και σε ασιατικό λαβράκι, *Lates calcarifer* (Fenner *et al.*, 2006). Οι διακυμάνσεις όμως στην ειδικότητα και την ευαισθησία την καθιστούν επισφαλής στη διάγνωση υποκλινικών μολύνσεων (Shetty *et al.*, 2012).

1.3.5.2.3 Ανοσοϊστοχημεία

Η ανοσοϊστοχημεία είναι η καταλληλότερη διαγνωστική μέθοδος για ανίχνευση του ιού σε ιστούς που έχουν υποστεί επεξεργασία για ιστολογική ανάλυση (ΟΙΕ, 2016). Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την αξιολόγηση της ιστικής κατανομής των ιών και μπορεί να ανιχνεύσει λοιμώξεις με χαμηλό επιπολασμό, ακόμα και όταν δεν έχουν αναπτυχθεί ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις (π.χ. κενотоπίαση) (Le Breton *et al.*, 1997). Επιπλέον, με τη μέθοδο αυτή, γίνεται εφικτός ο εντοπισμός των κυττάρων - στόχων του ιού μέσα σε ένα όργανο και η συσχέτιση τους με τις παρατηρούμενες παθολογικές μεταβολές (Lopez-Jimena *et al.*, 2012). Για αυτούς τους λόγους η ανοσοϊστοχημεία έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες της παθογένειας της νόσου, όπου έχει διαπιστωθεί νευροτροπισμός των Betanoda- ιών (Grotmol *et al.*, 1999· Peducasse *et al.*, 1999· Johansen *et al.*, 2005· Lopez-Jimena *et al.*, 2012).

1.3.5.2.4 Κυτταροκαλλιέργειες

Η απομόνωση Betanoda-ιών σε κυτταροκαλλιέργειες έχει εφαρμοστεί από αρκετούς ερευνητές και έχει βοηθήσει στην κατανόηση μηχανισμών που αφορούν στη μετάδοση, τον πολλαπλασιασμό και την κυτταροπαθογόνο δράση του ιού. Η πρώτη απόπειρα απομόνωσης του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια έγινε το 1996, όταν αναπτύχθηκε η κυτταρική σειρά SSN-1, που προέρχεται από το ψάρι του γλυκού νερού Striped Snakehead (*Channa striatus*), στην οποία πολλαπλασιάστηκε ένας Betanoda-ιός από νοσούντες προνύμφες λαβρακιού (Frerichs *et al.*, 1996). Στην ίδια κυτταρική σειρά απομονώθηκε επιτυχώς ένας άλλος Noda-ιός, προερχόμενος από atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) με κλινικά συμπτώματα, ο οποίος δεν έχασε τη μολυσματικότητα του μετά από επαναλαμβανόμενες ανακαλλιέργειες (Dannevig *et al.*, 2000). Έκτοτε, η εν λόγω κυτταρική σειρά έχει χρησιμοποιηθεί για τον

πολλαπλασιασμό αρκετών Betanoda-ιών από πληθώρα ειδών ψαριών. Η SSN-1 κυτταρική σειρά είναι κατάλληλη για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των γενοτύπων των Betanoda-ιών (Iwamoto *et al.*, 1999). Μειονέκτημα της ωστόσο αποτελεί, ο θερμοεξαρτώμενος πολλαπλασιασμός των ιών. Ένας κλώνος της κυτταρικής σειράς SSN-1, η κυτταρική σειρά E-11, θεωρήθηκε καταλληλότερη για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των Betanoda-ιών, λόγω της σταθερής παρουσίας κυτταροπαθογόνου αποτελέσματος (Iwamoto *et al.*, 2000). Και οι δύο κυτταρικές σειρές είναι επίμονα μολυσμένες με έναν ρετροϊό τύπου C, γεγονός όμως στο οποίο μπορεί να οφείλεται η ευαισθησία τους σε ιούς του θαλασσινού νερού (Iwamoto *et al.*, 1999). Πλεονέκτημα τους αποτελεί η παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων Noda-ιών (10^9 - 10^{10} TCID₅₀/ml θρεπτικού υποστρώματος).

Εκτός των κυτταρικών σειρών SSN-1 και E-11, έχουν αναπτυχθεί και άλλες, οι οποίες όμως είναι κατάλληλες για την απομόνωση λιγότερων ειδών Betanoda-ιών. Το 1999, αναπτύχθηκε η κυτταρική σειρά GF από κύτταρα πτερυγίου του ψαριού orange spotted grouper, η οποία όμως είναι ευαίσθητη μόνο στον ιό Grouper Nervous Necrosis Virus, GNNV (Chi *et al.*, 1999). Δύο χρόνια αργότερα, οι Lai και συνεργάτες (2001) ανέπτυξαν από ιστό εγκεφάλου yellow grouper την κυτταρική σειρά GB, ευαίσθητη μόνο στον ιό Yellow Grouper Nervous Necrosis Virus, YGNNV και οι Chang και συνεργάτες (2001) τη σειρά SF, ευαίσθητη σε έξι είδη Noda-ιών. Το 2002, οι Aranguren και συνεργάτες ανέφεραν απομόνωση του ιού RGNNV στην κυτταρική σειρά TF, που έχει παρασκευαστεί από επιθηλιακά κύτταρα ουραίου πτερυγίου καλκανιού. Έχουν διενεργηθεί και άλλες επιτυχείς απομονώσεις Betanoda-ιών στις κυτταρικές σειρές BB (Chi, Wu and Cheng, 2005), SSIS (Parmaseran *et al.*, 2006) και SISK (Sahul Hameed *et al.*, 2006), προερχόμενες από εγκέφαλο, σπλήνα και νεφρό ασιατικού λαβρακιού (*Lates carcarifer*), όπως επίσης και στις σειρές SIMH και SIGE, που έχουν δημιουργηθεί από κύτταρα της καρδιάς του είδους *Chanos chanos* και από

κύτταρα του οφθαλμού του είδους *Epinephelus coioides* (Parmaseran *et al.*, 2007) αντίστοιχα.

1.3.5.2.5 Ανεύρεση των ιικών σωματιδίων με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο

Η μικροσκοπική παρατήρηση ιστών που παρουσιάζουν αλλοιώσεις οφειλόμενες σε Betanoda-ιούς είναι μία αξιόπιστη μέθοδος που παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την κατανόηση της φύσης της λοίμωξης. Κατά την παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο χαρακτηριστική είναι η παρουσία ελεύθερων στο κυτταρόπλασμα ή προσκολλημένων στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτυωτού σφαιρικών ιικών σωματιδίων στα νευρικά κύτταρα. Τα κύτταρα που περιέχουν ιικά σωματίδια συνήθως είναι οι νευρώνες, τα ολιγοδενδροκύτταρα, μικρογλοιακά κύτταρα και τα αστροκύτταρα (Yoshikoshi and Inoue 1990, Bloch *et al.*, 1991, Grotmol *et al.*, 1997b). Εκτός του νευρικού συστήματος έχει διαπιστωθεί η παρουσία ιικών σωματιδίων στα βραγχιακά στηρικτικά κύτταρα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα που είναι προσκολλημένα στο ενδοκάρδιο, στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα και σε κύτταρα του επικαρδίου στο ψάρι atlantic halibut (Grotmol *et al.*, 1997b).

1.3.5.2.6 Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης ιού

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης έπεται από αντίστροφη μεταγραφή του ιικού γενώματος (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR), θεωρείται η κύρια διαγνωστική μέθοδος για την ανίχνευση των Betanoda-ιών, καθώς παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεθόδους. Ο συνεχώς αυξανόμενος αριθμός των διαθέσιμων αλληλουχιών του γενώματος των Betanoda-ιών, επέτρεψε την ανάπτυξη πληθώρας πρωτοκόλλων RT-PCR, τα οποία

μπορούν να βελτιστοποιηθούν, ανάλογα με την κάθε φορά επιδιωκόμενη ειδικότητα (OIE, 2016). Το πρώτο ζεύγος εκκινητών που σχεδιάστηκε για την ενίσχυση της T4 μεταβλητής περιοχής του RNA2 γενωμικού τμήματος του SJNNV (Nishizawa *et al.*, 1994), έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες, τόσο για διαγνωστικούς όσο και για ερευνητικούς σκοπούς. Ωστόσο, οι εκκινητές αυτοί δεν κατέστησαν ικανοί για την ανίχνευση του ιού σε όλες τις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, εξαιτίας ορίων στην ειδικότητα και την ευαισθησία. Οι Nishizawa και συνεργάτες (1996) παρατήρησαν ότι πολύ μικρές συγκεντρώσεις του ιού, που ανευρίσκονταν κυρίως σε υποκλινικά μολυσμένους γεννήτορες, διέφευγαν των ορίων ανίχνευσης της μεθόδου, οδηγώντας έτσι σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Από τη άλλη πλευρά, ο Thiery και συνεργάτες (1999a) ανέφεραν ότι οι εν λόγω εκκινητές δεν ήταν σε θέση να αναγνωρίσουν το γονιδίωμα στελεχών Betanoda-ιών που προέρχονταν από τον Ατλαντικό ωκεανό, εξαιτίας της γενετικής ποικιλομορφίας των απομονώσεων. Επιπροσθέτως, οι Grotmol και συνεργάτες (2000) υπέθεσαν ότι η γενετική παραλλακτικότητα των Betanoda-ιών θα είχε ως αποτέλεσμα αναντιστοιχίες μεταξύ των ολιγονουκλεοτιδίων και των περιοχών στόχων τους, επηρεάζοντας τη διαγνωστική ισχύ της μεθόδου. Έπειτα από τη δημοσίευση του ζεύγους εκκινητών F2-R3, αναπτύχθηκαν αρκετά πρωτόκολλα RT-PCR και ένθετης RT-PCR, ορισμένα εκ των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 7. Η ένθετη RT-PCR είναι 10-100 φορές πιο ευαίσθητη από την κλασσική RT-PCR, (Thiery *et al.*, 1999b· Dalla Valle *et al.*, 2000) και μπορεί να εφαρμοστεί για την ανίχνευση του ιού σε υποκλινικά μολυσμένα άγρια και εκτρεφόμενα ψάρια (Dalla Valle *et al.*, 2000· Gomez *et al.*, 2004· Gomez *et al.*, 2008).

Τα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν από τους Dalla Valle και συνεργάτες (2000) και Thiery και συνεργάτες (1999b), δοκιμάστηκαν σε απομονώσεις μεσογειακής προέλευσης, ενώ το πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε από τον Grotmol και συνεργάτες (2000) είναι κατάλληλο για την ανίχνευση στελεχών χαμηλής θερμοκρασίας υδάτων.

Παρά το γεγονός ότι έχουν αναπτυχθεί πρωτόκολλα ένθετης PCR με αυξημένη ευαισθησία, η μέθοδος παραμένει χρονοβόρα και επιρρεπής σε επιμολύνσεις, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Επιπλέον, όντας ποιοτική μέθοδος, δεν είναι σε θέση να προσδιορίσει τον ακριβή αριθμό των αντιγράφων του ιού στα δείγματα που εξετάζονται. Η παράμετρος αυτή είναι απαραίτητη για τον έλεγχο και τη μελέτη της παθογένειας της νόσου.

Η ανάπτυξη της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real-time PCR) συνετέλεσε στο να ξεπεραστούν τα ανωτέρω μειονεκτήματα, προσφέροντας αξιόπιστα αποτελέσματα συνοδευόμενα από ελάττωση του χρόνου επεξεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων.

Οι Dalla Valle και συνεργάτες (2005), αναφέρουν την ανάπτυξη δύο real-time PCR με βάση τη φθορίζουσα χρωστική SYBR Green I για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των δύο γενωμικών τμημάτων RNA1 και RNA2 των Betanoda-ιών σε βιολογικά δείγματα. Η μέθοδος μπορούσε να ανιχνεύσει τους τέσσερις γενότυπους του γένους *Betanodavirus* και επικυρώθηκε μερικώς με τη δοκιμή μιας RGNNV απομόνωσης. Συγκρίνοντας μάλιστα την ευαισθησία της μεθόδου με εκείνες της συμβατικής RT-PCR και της απομόνωσης του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες, οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι η real-time PCR είχε 10 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία.

Πρόσφατα στην ποσοτική real-time PCR έχει χρησιμοποιηθεί η τεχνολογία των TaqMan ιχνηλατών, με την οποία μπορεί να επιτευχθεί ακόμα μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα σε σχέση με τη χημεία SYBR Green. Οι Korsnes και συνεργάτες (2005), Grove και συνεργάτες (2006) και Nerland και συνεργάτες (2007) ανέπτυξαν πρωτόκολλα real-time TaqMan PCR για την ανίχνευση στελεχών Betanoda-ιών που προέρχονταν από τον Ατλαντικό ωκεανό, στα είδη Atlantic halibut και Atlantic salmon. Οι μέθοδοι όμως αυτοί δεν ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν στελέχη που προσβάλουν Μεσογειακά είδη. Το 2010, οι Hick και Whittington ανέπτυξαν μία

TaqMan qPCR με υψηλή επαναληψιμότητα και 10 - 1000 φορές μεγαλύτερη ευαισθησία από αυτή της ένθετης RT-PCR για τον RGNNV γενότυπο. Η ειδικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε επίσης, αλλά το πρωτόκολλο δεν δοκιμάστηκε σε απομονώσεις ψυχρών υδάτων. Έτσι το 2010 οι Panzarini και συνεργάτες παρουσίασαν την ανάπτυξη μίας real-time Taqman PCR που ανιχνεύει το RNA-2 γενωμικό τμήμα όλων τους γενότυπων Betanoda-ιών σε κλινικά δείγματα. Η μέθοδος αυτή συγκρινόμενη με την ημιένθετη RT-PCR και την απομόνωση σε κυτταροκαλλιέργειες είχε όριο ανίχνευσης 100 φορές χαμηλότερο. Επιπλέον ήταν ταχύτερη και πιο ειδική όταν συγκρίθηκε με τη χημεία SYBR Green. Τέλος οι Baud και συνεργάτες (2015) ανέφεραν την ανάπτυξη μίας one-step real-time PCR που στοχεύει στο RNA-1 γενωμικό τμήμα του ιού. Η μέθοδος αυτή αυξάνει ακόμη περισσότερο την ταχύτητα της δοκιμής, μειώνει τον κίνδυνο επιμολύνσεων, ενώ θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για την επιβεβαίωση αμφίβολων αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από μεθόδους που ανιχνεύουν το RNA-2 γενωμικό τμήμα, όταν τα ιικά φορτία προσεγγίζουν τα όρια ανίχνευσης ή όταν μεταλλάξεις σε στοχοθετημένες περιοχές επηρεάζουν τη δέσμευση των ανιχνευτών.

Αν και η βελτιστοποίηση πρωτοκόλλων real-time PCR έχει συντελέσει στην επίτευξη πολύ χαμηλών ορίων ανίχνευσης και στον προσδιορισμό της ακριβούς συγκέντρωσης του ιού στα εξεταζόμενα βιολογικά δείγματα, ωστόσο δεν καθιστά εφικτή την εκτίμηση της λοιμογόνου ικανότητας και της παθογόνου δράσης του. Ως εκ τούτου, η παρατήρηση της κυτταροπαθογόνου δράσης του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες δεν μπορεί να αντικατασταθεί, ιδίως όταν μελετώνται αυτοί οι παράγοντες.

Η αλληλούχιση του ιικού γονιδιώματος, εκτός του ότι είναι πολύτιμη για την επιβεβαίωση της διάγνωσης, είναι επίσης θεμελιώδους σημασίας για επιδημιολογικές μελέτες του ιού. Η ανάλυση της αλληλουχίας της μεταβλητής περιοχής T4 του RNA2 γενωμικού τμήματος (Nishizawa *et al.*, 1997) επιτρέπει την κατάταξη κάθε απομόνωσης σε έναν γενότυπο. Ωστόσο, η φυλογενετική

ανάλυση με βάση την αλληλουχία και των δύο γενωμικών τμημάτων RNA1 - RNA2, φαίνεται να είναι πιο κατατοπιστική και συνίσταται από το Διεθνές Γραφείο Επιζωοτιών, καθώς μπορεί να φανερώσει πιθανές περιπτώσεις γενετικού ανασυνδυασμού μεταξύ διαφορετικών γενότυπων των Betanoda-ιών και εντός ενός γενότυπου (Oliveira *et al.*, 2009· Panzarin *et al.*, 2012· Toffolo *et al.*, 2007).

Πολύ πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί και άλλες μέθοδοι για γρήγορη και ακριβή ανίχνευση Betanoda-ιών όπως: η μοριακή μέθοδος Loop-Mediated-Isothermal-Amplification (LAMP) (Xu *et al.*, 2010), η πραγματικού χρόνου LAMP (Mekata *et al.*, 2014), η δοκιμή ανοσο-μαγνητικής μείωσης (immunomagnetic reduction assay), η οποία χρησιμοποιεί μαγνητικά νανοσωματίδια επικαλυμμένα με δεξτράνη και αντισώματα (Yang *et al.*, 2012), το σύστημα microfluidic LAMP (Wang *et al.*, 2011), το σύστημα RT-PCR microfluidic chip με τεχνολογία φλουερεσκεΐνης που εισάγεται από laser (Kuo *et al.*, 2012b), το microfluidic σύστημα που βασίζεται σε μοριακά beacons και μαγνητικό διαχωρισμό (Su *et al.*, 2015b) και οι βιοαισθητήρες πλευρικής ροής (lateral flow biosensor) που βασίζονται σε νανοσωματίδια (Toubanaki, Margaroni and Karagouni, 2015).

1.3.5.2.7 Ανίχνευση αντισωμάτων

Παρόλο που οι ορολογικές δοκιμές ανίχνευσης αντισωμάτων χρησιμοποιούνται ευρέως στη διάγνωση των νοσημάτων των χερσαίων θηλαστικών, δεν έχουν ευρεία εφαρμογή στη διαχείριση της υγείας των υδρόβιων οργανισμών (LaPatra, 1996). Επειδή ο πληθυσμός αντισωμάτων IgM είναι ο επικρατέστερος στον ορό των ψαριών, οι χημικές αντιδράσεις μπορεί να μην είναι ειδικές, γεγονός το οποίο θα πρέπει να συνεκτιμάται στον σχεδιασμό των ορολογικών δοκιμών και να εξασφαλίζεται επαρκής αριθμός δειγμάτων-μαρτύρων (Denzin and Staak, 2000). Αρκετές ορολογικές δοκιμές για την ανίχνευση αντισωμάτων Betanoda-ιών έχουν

περιγράφει στη διεθνή βιβλιογραφία (Mushiake *et al.*, 1992· Scapigliati *et al.*, 1996· Breuil and Romestand, 1999· Huang *et al.*, 2001· Grove *et al.*, 2003· Jaramillo *et al.*, 2016). Η ανοσοενζυμική δοκιμή της ELISA περιλαμβάνει την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι των Betanoda-ιών στο αίμα και άλλα σωματικά υγρά. Είναι λιγότερο ευαίσθητη από την RT-PCR (Nishizawa *et al.*, 1994· Huang *et al.*, 2001), αλλά περισσότερο φθηνή και γρήγορη, ώστε να χρησιμοποιείται σε επίπεδο μονάδας (Huang *et al.*, 2001), κυρίως για τον έλεγχο των γεννητόρων (Breuil and Romestand, 1999). Επιπλέον δεν έχει τη δυνατότητα εντοπισμού των αρχικών σταδίων της λοίμωξης, καθώς δεν έχει ακόμα ξεκινήσει η παραγωγή των ειδικών αντισωμάτων έναντι του ιού. Από τους τύπους της ELISA, η ανταγωνιστική (competitive ELISA) έχει το πλεονέκτημα ότι διαχωρίζει ψευδώς θετικά αποτελέσματα και μη ειδικές αντιδράσεις και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αντισωμάτων από διαφορετικά είδη ψαριών (Denzin and Staak, 2000). Από την άλλη πλευρά, η έμμεση sandwich ELISA (indirect sandwich ELISA) είναι 4 - 8 φορές πιο ευαίσθητη και έχει μεγαλύτερη ικανότητα διαχωρισμού μεταξύ των θετικών και αρνητικών δειγμάτων από την ανταγωνιστική ELISA, καθιστώντας την καταλληλότερη για έλεγχο πληθυσμών (Jaramillo *et al.*, 2016). Σύμφωνα με παρατηρήσεις πεδίου, τίτλος ELISA $\geq 1:40$ είναι ενδεικτικός ιικής λοίμωξης, ενώ τιμές $\leq 1:10$ είναι ενδεικτικές δειγμάτων απαλλαγμένων του ιού (Watanabe *et al.*, 2000). Επειδή η έρευνα στο πεδίο αυτό είναι ανεπαρκής, η ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων έναντι του ιού στον ορό των ψαριών δεν χρησιμοποιείται ως μέθοδος ρουτίνας για τον έλεγχο των πληθυσμών των ψαριών (OIE, 2016).

1.3.6 Πρόληψη

Από τη στιγμή που σε μία εκτροφή εκδηλώνεται κρούσμα ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας, είναι πολύ δύσκολος ο περιορισμός του παθογόνου παράγοντα, καθώς οι Betanoda-ιοί συγκαταλέγονται στους πιο ανθεκτικούς ιούς που προσβάλλουν τα ψάρια (Flerichs *et al.*, 1996). Πρωταρχικός λοιπόν στόχος για την πρόληψη της νόσου σε επίπεδο εκτροφής θα πρέπει να είναι η προσπάθεια αποτροπής εισόδου του παθογόνου παράγοντα. Η εφαρμογή προληπτικών μέτρων υγιεινής και καλύτερων πρακτικών διαχείρισης (Better Management Practices, BMPs) αποτελούν παράγοντες πρωταρχικής σημασίας (Shetty *et al.*, 2012). Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται: η ποιοτική διατροφή, η τήρηση των κανόνων υγιεινής, η χρήση προβιοτικών και ανοσοενισχυτικών, η εξυγίανση του νερού τροφοδοσίας κ.α.

Εξαιτίας της δυνατότητας κάθετης μετάδοσης της νόσου και λόγω της αυξημένης ευπάθειας των ψαριών σε πολύ πρώιμα στάδια ανάπτυξης θα πρέπει να λαμβάνονται μέτρα όπως:

α) Έλεγχος των γεννητόρων για παρουσία Betanoda-ιών σε ωοθηκικό ιστό, αυγά και σπέρμα με RT-PCR και για παρουσία ειδικών αντισωμάτων του ιού στον ορό με τη μέθοδο της ELISA (Breuil *et al.*, 2000· Watanabe, Nishizawa and Yoshimizu, 2000). Η χρήση ένθετης RT-PCR και real-time PCR αντί της κλασσικής RT-PCR είναι προτιμότερη λόγω της μεγαλύτερης ευαισθησίας των μεθόδων αυτών (Dalla Valle *et al.*, 2000· Panzarin *et al.*, 2010). Μόνο αρνητικοί γεννήτορες θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για αναπαραγωγή, ενώ οι θετικοί γεννήτορες θα πρέπει να απομακρύνονται από την εκτροφή και να εξολοθρεύονται.

β) Πλύση των αυγών με θαλασσινό νερό που περιέχει όζον (Arimoto *et al.*, 1996· Grotmol and Totland, 2000· Buchan *et al.*, 2004), ή με ηλεκτρολυμένο θαλασσινό νερό

(Watanabe *et al.*, 2013) για την αδρανοποίηση του ιού που ενδεχομένως βρίσκεται προσκολλημένος στην επιφάνεια τους.

γ) Έλεγχος των εκκολαπτόμενων προνυμφών ή του εισαγόμενου γόνου για παρουσία του ιού με PCR (Mori *et al.*, 1998· Watanabe *et al.*, 1998).

Καθώς η νόσος παρατηρείται συχνότερα σε προνύμφες που προέρχονται από αυγά που συλλέχθηκαν κατά τα τέλη της αναπαραγωγικής περιόδου, ο περιορισμός του αριθμού των ωοτοκιών θα μπορούσε να περιορίσει το ενδεχόμενο κάθετης μετάδοσης του ιού (Mushiake *et al.*, 1994). Η μείωση επίσης της πυκνότητας των προνυμφών στις δεξαμενές, μπορεί να δώσει καλά αποτελέσματα (Munday *et al.*, 2002), ενώ ο εμβολιασμός των γεννητόρων είναι μία ακόμα υποσχόμενη ενέργεια πρόληψης για τον περιορισμό της εξάπλωσης του ιού στα αυγά.

Η οριζόντια μετάδοση της νόσου μπορεί να αποφευχθεί με την αποφυγή εκτεταμένης ανάμιξης παρτίδων προνυμφών/ιχθυδίων (Samuelsen *et al.*, 2006). Άλλοι τρόποι πρόληψης που μπορούν να εξεταστούν αποτελούν η καραντίνα των νεοεισερχόμενων ψαριών και η απολύμανση των δεξαμενών μεταξύ των παρτίδων και η δημιουργία ζωνών ελεύθερων του ιού (Munday *et al.*, 2002).

Σε γενικές γραμμές, οι οξείες λοιμώξεις είναι εύκολο να γίνουν αντιληπτές λόγω της εμφάνισης τυπικών κλινικών συμπτωμάτων της νόσου. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται όμως στον έλεγχο υποκλινικά μολυσμένων ψαριών που λειτουργούν ως δεξαμενές του ιού στο περιβάλλον της εκτροφής, όπως οι γεννήτορες ή οι νεοεισερχόμενες παρτίδες χωρίς κλινικά συμπτώματα. Επιπλέον, η διερεύνηση των θνησιμοτήτων στα ψάρια νεαρής ηλικίας, που μπορεί να παρατηρούνται ανεξάρτητα από την παρουσία κάποιου παθογόνου παράγοντα και να θεωρούνται σε κάποιες περιπτώσεις φυσιολογικές και αναμενόμενες, δεν πρέπει να διαφεύγει της προσοχής της διαχείρισης της υγείας της εκτροφής.

1.3.6.1 Χημειοθεραπευτικές ουσίες

Τα τελευταία χρόνια έχει διερευνηθεί η χρήση χημειοθεραπευτικών ουσιών για τον έλεγχο της λοίμωξης από Betanoda-ιούς με ποικίλα αποτελέσματα.

Η ριμπαβιρίνη (1-b-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά με την RdRp του ιού RGNNV *in vitro* και αναστέλλει την ιική μόλυνση (Huang *et al.*, 2015b). Το ιικό φορτίο μειώθηκε και με τη χρήση ολιγονόλης (φαινολικό εκχύλισμα του φρούτου Litchi chinensis), όταν αυτή χορηγήθηκε κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης, υποδηλώνοντας ότι αυτό το φάρμακο μπορεί να επηρεάσει την προσκόλληση των ιικών σωματιδίων στα κύτταρα του ξενιστή (Ichinose, 2013).

Η χρήση αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) και η ικανότητά τους να ρυθμίζουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, προτάθηκε ως πιθανή μέθοδος θεραπείας νοσούντων ψαριών από Betanoda-ιούς. Όταν δύο αντιμικροβιακά πεπτίδια, το TH1-5 (Tilapia Hercidin 1-5) και το Epi-1 (epinedicin-1), δοκιμάστηκαν σε νοσούντα ψάρια, παρατηρήθηκε ότι το TH1-5 βοήθησε στη μείωση του ιικού φορτίου κατά τη διάρκεια της λοίμωξης και το Epi-1 εξουδετέρωσε τον ιό κατά τη διάρκεια και μετά τη λοίμωξη (Wang, Rajanbabu and Chen, 2015).

Οι άλφα-κρυσταλλίνες είναι πρωτεΐνες που βρίσκονται σε όλα τα σπονδυλωτά και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση του ξενιστή έναντι του στρες (Wistom *et al.*, 1994). Οι Chen και συνεργάτες (2011b) έδειξαν ότι οι κρυσταλλίνες από orange-spotted grouper αποτρέπουν την πρωτεϊνική συσσώρευση που προκαλείται από τη θερμότητα και το οξειδωτικό στρες, αυξάνοντας την αντοχή κυττάρων στο στρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιοξειδωτική θεραπεία (Chen *et al.*, 2011b).

Μία άλλη κατηγορία ουσιών, οι ιντερφερόνες προτάθηκαν για χρησιμοποίηση στη θεραπεία ιογενών λοιμώξεων, λόγω της ικανότητάς τους για μη ειδικές απαντήσεις

(Strannegård *et al.*, 2000). Το 2016, οι Kuo και συνεργάτες παρατήρησαν ότι η ενδοπεριτοναϊκή και από το στόμα χορήγηση ιντερφερόνης από grouper (gIFN) και ιντερφερόνης από σολομό (sIFN) σε προνύμφες στήρας μαλαμπάρ είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη αξιοσημείωτης προστατευτικής δράσης έναντι της μόλυνσης από Betanoda-ιούς (Kuo *et al.*, 2016).

1.3.6.2 Εμβολιασμοί

Ο εμβολιασμός έχει χρησιμοποιηθεί στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας από τις αρχές της δεκαετίας του 1990 και σήμερα αποτελεί σημαντικό όπλο στην πρόληψη των ασθενειών, με την ανάπτυξη πολλών εμπορικά διαθέσιμων εμβολίων έναντι βακτηρίων και ιών των ψαριών. Παρά ωστόσο τις επίμονες ερευνητικές προσπάθειες για την ανάπτυξη ενός εμβολίου έναντι των Betanoda-ιών, ελάχιστα εμπορικά σκευάσματα είναι σήμερα διαθέσιμα, μεταξύ των οποίων αδρανοποιημένα RGNNV εμβόλια για την πρόληψη της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας στο ψάρι *seveband grouper* στην Ιαπωνία (OIE, 2016) και στο ευρωπαϊκό λαβράκι στη Μεσόγειο.

Τα ψάρια που επιβιώνουν από τη νόσο παράγουν εξουδετερωτικά αντισώματα, γεγονός που εξηγεί την αντίστασή τους σε φυσικές επαναμολύνσεις (Tanaka *et al.*, 2001). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι ο εμβολιασμός θα μπορούσε να αποτελέσει ένα λογικό και αποτελεσματικό μέσο για τον έλεγχο της νόσου. Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, διάφορες μελέτες έχουν καταδείξει ότι ο εμβολιασμός προσφέρει ορισμένου βαθμού προστασία έναντι των λοιμώξεων από Betanoda-ιούς. Διάφορες μέθοδοι εμβολιασμού έχουν αναπτυχθεί όπως η χρήση αδρανοποιημένου ιού, ανασυνδυασμένης ιικής καψιδιακής πρωτεΐνης ή όμοιων με ιό σωματιδίων που παράγονται σε διάφορα συστήματα έκφρασης. Η αξιολόγηση της

αποτελεσματικότητας των τεχνικών αυτών επικεντρωνόταν στη μέτρηση των παραγόμενων αντισωμάτων μετά τον εμβολιασμό ή στον προσδιορισμό του σχετικού ποσοστού επιβίωσης (relative percent survival, RPS) μετά από μόλυνση με τον ιό.

Τα περισσότερα από τα εμβόλια που αναπτύχθηκαν για την πρόληψη από Betanoda-ιούς στα ψάρια του θαλασσινού νερού περιέχουν αδρανοποιημένους ιούς (Yamashita *et al.*, 2005· Parkingking *et al.*, 2009· Pakingking *et al.*, 2010). Παρατηρήθηκε παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων και σημαντικά επίπεδα προστασίας, ενώ υπήρχαν επίσης ενδείξεις καταστολής της ιικής αντιγραφής στους εγκεφάλους και τους νεφρούς των εμβολιασμένων ψαριών. Ωστόσο η αποτελεσματικότητα αυτών των εμβολίων ίσως να είναι περιορισμένη επειδή η μετουσίωση οδηγεί σε απώλεια της αντιγονικότητας, ενώ το κόστος παρασκευής αδρανοποιημένων εμβολίων είναι αρκετά υψηλό, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό όταν απαιτείται μεγάλης κλίμακας ανοσοποίηση.

Έναντι Betanoda-ιών έχουν αναπτυχθεί και εμβόλια με τη χρήση ανασυνδυασμένης καψιδιακής πρωτεΐνης, εκφρασμένης σε *Escherichia coli*, που οδήγησαν στην παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι του ιού σε κοκάλι, Striped jack (Nakai *et al.*, 1995), σε sevenband grouper (Tanaka *et al.*, 2001), σε προνύμφες καλκανιού (Husgaro *et al.*, 2001· Sommerset *et al.*, 2005), σε humpback grouper (*Cromileptes altivelis*) (Yuasa *et al.*, 2002). Πιο πρόσφατα, η χορήγηση σε προνύμφες ασιατικού λαβρακιού, μίας ενισχυμένης ανασυνδυασμένης καψιδιακής πρωτεΐνης ενός Betanoda-ιού που απομονώθηκε από ασιατικό λαβράκι, έδωσε τιμή RPS 76% (Vimal *et al.*, 2014).

Η χρήση σωματιδίων που ομοιάζουν με ιό (Virus-Like Particles, VLPs) θεωρείται μία πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση για την ανοσοποίηση των ψαριών έναντι των Betanoda-ιών. Όταν οι ιικές δομικές πρωτεΐνες υπερεκφράζονται, αυθόρμητα σχηματίζουν όμοια με τον ιό σωματίδια, τα οποία είναι αντιγονικά ταυτόσημα με τους ιούς που απαντώνται στη φύση. Τα VLPs θεωρούνται τόσο αποτελεσματικά όσο και οι

αδρανοποιημένοι Betanoda-ιοί και αποτελούν μια ασφαλή εναλλακτική λύση αντί των ζωντανών εξασθενημένων εμβολίων, καθώς δεν περιέχουν γενετικό υλικό του ιού και, επομένως, δεν έχουν λοιμογόνο ικανότητα. Εμβόλια με τη χρήση VLPs παραγμένων σε *E. Coli* έχουν μελετηθεί σε στήρα μαλαμπάρ, *Epinephelus malabaricus*, dragon grouper *Epinephelus lanceolatus* (Liu *et al.*, 2006) και σε orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* (Lai *et al.*, 2014). Σε όλες τις περιπτώσεις διαπιστώθηκε η ανάπτυξη υψηλών τίτλων εξουδετερωτικών αντισωμάτων στα ψάρια ενώ στα orange spotted grouper παρατηρήθηκε έκφραση γονιδίων σχετιζόμενων με την κυτταρική και χυμική ανοσία στο ήπαρ, τον σπλήνα και τον πρόσθιο νεφρό, μόλις 12 ώρες μετά τον εμβολιασμό. Η παραγωγή VLPs του RGNNV έχει επιχειρηθεί επίσης σε *Baculovirus* και στον μύκητα *Saccharomyces cerevisiae*, για την ανοσοποίηση ευρωπαϊκού λαβρακιού (Thiery *et al.*, 2006) και grouper *Epinephelus septemfasciatus* (Wi *et al.*, 2015) αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση η προστατευτική δράση ήταν δοσοεξαρτώμενη, ενώ στη δεύτερη περίπτωση ήταν της τάξεως του 100%, όταν χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά.

Ένας άλλος τύπος εμβολίων, τα συνθετικά πεπτίδια, μελετήθηκαν έναντι των Betanoda-ίων σε λαβράκι, χωρίς ωστόσο να καταστούν ικανά να προστατεύσουν τα ψάρια, καθώς η παραγωγή αντισωμάτων ήταν πολύ μικρή σε σύγκριση με εκείνη που παρατηρείται μετά από χορήγηση του πλήρους ιού (Coeurdacier *et al.*, 2003).

Τέλος, έχει διερευνηθεί η δυνατότητα χρήσης DNA εμβολίων για τον έλεγχο της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας. Η ικανότητα των DNA εμβολίων που παράγονται από ραβδοϊούς να επάγουν μη ειδική ανοσολογική απόκριση που δύναται να παρέχει προστασία έναντι άλλων ιών αξιοποιήθηκε σε μια μελέτη, όπου εξετάστηκε η ανοσοποίηση καλκανιού έναντι της μόλυνσης από Betanoda-ιούς, μετά από χορήγηση DNA- VHSV εμβολίου (Sommerset *et al.*, 2003). Η προστασία του εμβολίου αυτού εκφράστηκε μόνο κατά τα αρχικά στάδια της

μόλυνσης. Παράλληλα με την ανάπτυξη του AHNNV ανασυνδυασμένου εμβολίου που αναφέρεται παραπάνω, οι ίδιοι συγγραφείς παρήγαγαν ένα DNA εμβόλιο έναντι του AHNNV (Sommerset *et al.*, 2005). Το εμβόλιο όμως αυτό δεν ήταν σε θέση να επάγει ανοσολογική απόκριση ή να προστατεύσει τα εμβολιασμένα ψάρια σε αντίθεση με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη, παρά το γεγονός ότι η μεταγραφή και μετάφραση του DNA του ήταν εμφανής στον μυϊκό ιστό. Σε αντίθεση, ο εμβολιασμός ασιατικού λαβρακιού μεγαλύτερου μεγέθους με DNA εμβόλιο παραγμένο από Betanoda-ιό που απομονώθηκε από ασιατικό λαβράκι, προκάλεσε σημαντική αύξηση του επιπέδου αντισωμάτων και τιμή RPS 77% (Vimal *et al.*, 2006). Η ηλικία φαίνεται να παίζει ρόλο στην ανοσοποίηση καθώς τα καλκάνια που χρησιμοποιήθηκαν από τους Sommerset και συνεργάτες ήταν 2,2 gr, ενώ τα λαβράκια 10-15 gr. Η χρήση ανοσοενισχυτικών ουσιών επίσης, μπορεί να αποτελεί το κλειδί για την ανάπτυξη αποτελεσματικών DNA εμβολίων, καθώς βοήθησαν στην ανάπτυξη υψηλότερου επιπέδου προστασίας σε προνύμφες orange spotted grouper (Chen, Peng, Chiou, 2015).

Τα ανωτέρω εμβόλια έχουν εφαρμοστεί με ενδοπεριτοναϊκή ή ενδομυϊκή ένεση σε νεαρά και μεγαλύτερου μεγέθους ψάρια όχι όμως σε πρωιμότερα στάδια ανάπτυξης, όπου δεν μπορούν να χορηγηθούν με ενέσιμο τρόπο. Σε αυτές τις ηλικίες οι εμβολιασμοί από το στόμα ή με εμβάπτιση είναι οι πλέον κατάλληλοι για εφαρμογή, αν και έχουν εκφραστεί αμφιβολίες για την αποτελεσματικότητά τους λόγω του ότι δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως το ανοσοποιητικό σύστημα των ψαριών. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα ωστόσο είχε η χρήση ανασυνδυασμένης καψιδιακής πρωτεΐνης NNV, εκφρασμένης σε *E.coli* και ενθυλακωμένης σε *Artemia*, ως ένα τρόπος για την από το στόμα ανοσοποίηση προνυμφών orange-spotted grouper (Lin *et al.*, 2007). Η ίδια ερευνητική ομάδα, τέσσερα χρόνια αργότερα, διαπίστωσε υψηλότερη και πιο γρήγορη ανάπτυξη προστατευτικής δράσης όταν χρησιμοποίησε για την παραγωγή του ίδιου εμβολίου, το βακτήριο *Vibrio anguillarum* (Chen *et al.*, 2011a).

Εμβολιασμός με εμβάπτιση έχει χρησιμοποιηθεί για την ανοσοποίηση orange spotted grouper, με τη χρήση ενθυλακωμένων, αδρανοποιημένων σε φορμαλίνη, Betanodavirίων (Kai and Chi, 2008), με ικανοποιητικά αποτελέσματα προστασίας που διατηρήθηκαν για τουλάχιστον τρεις μήνες.

Οι ενέσιμοι εμβολιασμοί επίσης των γεννητόρων πριν την περίοδο ωοτοκίας μπορούν να μειώσουν την πιθανότητα κάθετης μετάδοσης (Olsen and Press, 1997· Kai *et al.*, 2010) ή να προστατέψουν τους γεννήτορες από τη δημιουργία φορέων.

Η χορήγηση ανοσοδιεγερτικών ουσιών έχει τέλος προταθεί ως ένας τρόπος για την ενίσχυση της ανοσολογικής απόκρισης των προνυμφών, πριν από την πλήρη ανάπτυξη του ανοσοποιητικού τους συστήματος. Διάφορες ανοσοενισχυτικές ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί όπως η ανασυνδυασμένη ανοσοτροποποιητική πρωτεΐνη Reishi (Kuan *et al.*, 2012) και ο παράγοντας poly I: C (Nishizawa *et al.*, 2011· Oh *et al.*, 2012), με ποικίλα αποτελέσματα.

1.4 ΑΙΘΕΡΙΟ ΕΛΑΙΟ ΡΙΓΑΝΗΣ

Τα αιθέρια έλαια είναι μίγματα πτητικών οργανικών ενώσεων, κατά κύριο λόγο πτητικών αρωματικών εστέρων ή αιθέρων, που προσδίδουν στο φυτό που τα παράγει τη χαρακτηριστική του οσμή. Είναι αδιάλυτα ή ελάχιστα διαλυτά στο νερό, ενώ διαλύονται στην αλκοόλη, στον αιθέρα, στον πετρελαϊκό αιθέρα, στα λιπαρά οξέα και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Περιέχονται σε διάφορα μέρη ή εκκρίματα φυτών όπως άνθη, καρποί, φύλλα, ρίζες, φλοιοί, κουκούτσια, ρετσίνι (Charles *et al.*, 1990). Η ποσότητα, η ποιότητα και η χημική σύνθεση των αιθέριων ελαίων εξαρτώνται από ποικίλους παράγοντες. Μεταξύ αυτών συγκαταλλέγονται ο γενότυπος, το στάδιο ανάπτυξης και το τμήμα του φυτού από το οποίο εξήχθησαν, οι κλιματικοί παράγοντες (θερμοκρασία, υγρασία, φως), οι εδαφικοί παράγοντες (εδαφική σύσταση, pH κ.α.), ο χρόνος και ο τρόπος συλλογής και μεταφοράς (Kamatou *et al.*, 2006).

Τα αιθέρια έλαια έχουν πλούσια χημική σύνθεση. Δύναται να εμπεριέχουν πάνω από εξήντα ουσίες. Ωστόσο, ελάχιστα κύρια συστατικά συγκροτούν έως και το 85% της σύνθεσης των αιθέριων ελαίων και προσδίδουν τις βασικές βιολογικές ιδότητες τους (Bakkali *et al.*, 2008), ενώ τα υπόλοιπα συστατικά ανευρίσκονται συνήθως ως ίχνη (Bader *et al.*, 2010· Rali *et al.*, 2007). Τα συστατικά των αιθέριων ελαίων αποτελούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού και υποδιαιρούνται σε δύο ευδιάκριτες ομάδες χημικών ουσιών, τους υδρογονάνθρακες και τις οξυγονομένες ενώσεις (Nagegowda, 2006· Pichersky *et al.*, 2006). Οι υδρογονάνθρακες αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από τερπένια και τερπενοειδή (μονοτερπένια, διτερπένια, σесκιτερπένια). Στις οξυγονομένες ενώσεις εμπεριέχονται κυρίως εστέρες, αλδεύδες, κετόνες, αλκοόλες, φαινόλες και οξειδία.

Η ρίγανη είναι ένα πολυετές φυτό που απαντάται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου και στις παραμεσόγειες χώρες (Ευρώπη, Αφρική), αλλά και στις εύκρατες ζώνες της Ασίας και της Αμερικής. Ανήκει στο γένος *Origanum* της οικογένειας των Χειλανθών

(Labiatae). Στο γένος *Origanum* συγκαταλλέγονται 43 είδη και 18 υποείδη ρίγανης (Skoula and Harborne, 2002), με περισσότερα διαδεδομένα στην Ελλάδα τα είδη *Origanum vulgare ssp. vulgare*, *Origanum vulgare ssp. Hirtum* και *Origanum onites*.

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης είναι υγρό, με χρώμα κίτρινο, κιτρινέρυθρο, οξεία γεύση και χαρακτηριστική έντονη οσμή. Τα κύρια συστατικά του είναι η καρβακρόλη, η θυμόλη, το γ-τερπινένιο και το π-κυμένιο. Η καρβακρόλη και η θυμόλη ανευρίσκονται στο αιθέριο έλαιο ρίγανης σε ποσοστό έως και 80% και 15% αντίστοιχα, και αποτελούν τα βασικά ενεργά συστατικά του ελαίου.

Οι ιδιότητες του αιθέριου ελαίου ρίγανης είναι πολλές και οφείλονται κυρίως στην περιεκτικότητά του σε καρβακρόλη και θυμόλη. Έχουν αναφερθεί αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές, αντιπαρασιτικές, αντιακές, αντιγλεγγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Δρα επιπλέον έναντι αλλεργιών, ως αντιβηχικό και αποχρεμπτικό, ως αναλγητικό, ενώ βοηθάει σημαντικά στη θεραπεία πεπτικών και εντερικών διαταραχών.

Στα παραγωγικά ζώα έχει χρησιμοποιηθεί σε σιτηρέσια χοίρων, μηρυκαστικών και πουλερικών για τον έλεγχο παθογόνων μικροοργανισμών ως εναλλακτική λύση έναντι στη χορήγηση αντιβιοτικών (Bampidis *et al.*, 2006· Busquet *et al.*, 2006· Benchaa *et al.*, 2008· Calsamiglia *et al.*, 2007· Cross *et al.*, 2007· Maenner *et al.*, 2011· Yang *et al.*, 2007).

Στις υδατοκαλλιέργειες έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό έναντι παρασιτώσεων από μυξοσπορίδια στην τσιπούρα και το μυτάκι (Athanasopoulou *et al.*, 2004 a,b), καθώς και έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Aeromonas hydrophila* στο γατόψαρο (Zheng *et al.*, 2009) και *Aeromonas sombria* στον κυπρίνο. Επιπροσθέτως, η χορήγηση διαιτητικού συμπληρώματος καρβακρόλης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συσσωρευτικής θνησιμότητας σε λαβράκια που είχαν μολυνθεί με *Listonella anguillarum* (Volpatti *et al.*, 2013), ενώ η διατροφή ιριδίζουσας πέστροφας με συμπλήρωμα αιθέριου ελαίου ρίγανης αποδείχθηκε ευεγερτική στην αύξηση των

ιχθυδίων και την αντίσταση του οργανισμού έναντι του *Lactococcus garvieae* (Diler *et al.*, 2017).

Πρόσφατα, έχουν δημοσιευτεί έρευνες που καταδεικνύουν προστατευτική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης έναντι ιών (Gilling *et al.*, 2014). Η προσθήκη καρβακρόλης σε κυτταροκαλλιέργειες που ενοφθαλμίστηκαν με norovirus, οδήγησε σε μείωση του τίτλου του ιού. Παρόμοια αποτελέσματα είχε η προσθήκη αιθέριου ελαίου ρίγανης στον πολλαπλασιασμό norovirus και feline calicivirus (Elizaquivel *et al.*, 2013). Αντιική δράση της καρβακρόλης και του αιθέριου ελαίου ρίγανης διαπιστώθηκε και έναντι των ιών ACVR-HHV-1, HHV-1, HRSV, BoHV-2 και BVDV (Pilau *et al.*, 2011).

1.4 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Το εύρος των ξενιστών των Betanoda-ιών ολοένα και διευρύνεται καθώς στελέχη του ιού διαρκώς ανευρίσκονται σε νέα είδη ιχθύων και διθύρων. Πρόσφατα μάλιστα σε εκτρεφόμενα είδη ψαριών από την περιοχή της Μεσόγειου ανιχνεύθηκαν γενότυποι που έως τότε ανευρίσκονταν αποκλειστικά στα ιαπωνικά ύδατα, ενώ μεγάλες θνησιμότητες σε εκτρεφόμενα ψάρια στην Ηβηρική χερσόνησο προκάλεσαν ανασυνδυασμένοι RGNNV/SJNNV ιοί. Αναλογιζομένων των ανωτέρω, στο πρώτο σκέλος των πειραμάτων της μεταπτυχιακής διατριβής επιδιώκεται η διερεύνηση της παρουσίας και της γενετικής παραλλακτικότητας του ιού σε αλιεύματα του νοτίου Αιγαίου, περιοχής στην οποία απαντώνται “ξενικά είδη”, προερχόμενα από ασιατικά ύδατα, τα οποία ενδεχομένως λειτουργούν ως φορείς γενότυπων διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών. Επιπλέον, επιδιώκεται ο εμπλουτισμός του καταλόγου των ψαριών που διερευνήθηκαν για παρουσία Betanoda-ιών στα ελληνικά ύδατα, σε συνέχεια επιδημιολογικής μελέτης του ιού που εκπονήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου MIS375267 .

Μεταξύ των βιολογικών ιδιοτήτων του αιθέριου ελαίου ρίγανης, πρόσφατα έχει αναφερθεί και η δράση του έναντι πληθώρας ιών. Δεδομένου ότι δεν έχει αναπτυχθεί έως σήμερα αποτελεσματική θεραπεία για τον έλεγχο της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας, στο δεύτερο σκέλος των πειραματισμών της μεταπτυχιακής διατριβής εξετάζεται η επίδραση της διατροφής με συμπλήρωμα αιθέριου ελαίου ρίγανης στην εκδήλωση και εξέλιξη της νόσου σε λαβράκια, μετά από ενδομυϊκή χορήγηση ιού RGNNV σε ιχθύδια του είδους. Ειδικότερα, οι πειραματισμοί έχουν στόχο τη διερεύνηση ενδεχόμενης επίδρασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης στη μείωση της θνησιμότητας και του ιικού φορτίου του ιού σε λαβράκια που διατράφηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτού.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψίες

Για τις ανάγκες του πρώτου σκέλους των πειραμάτων της μεταπτυχιακής διατριβής, ελήφθησαν δείγματα πρόσφατα αλιευμένων, εκτρεφόμενων και άγριων ψαριών ποικίλων ειδών, από ερασιτέχνες και επαγγελματίες αλιείς της Κρήτης και της Ρόδου, και από ιχθυοπωλείο και υδατοκαλλιέργεια της Ρόδου. Οι περιοχές αλίευσης των δειγμάτων αφορούσαν το Νότιο Αιγαίο και ειδικότερα τα θαλάσσια ύδατα της Ρόδου (Κάμειρος, Πρασονήσι), της νησίδας Μακρύ, της Λέρου, της Καρπάθου, της Κάσου και της νότιας Κρήτης. Στην εικόνα απεικονίζονται οι περιοχές προέλευσης των συλλεχθέντων αλιευμάτων.

Η χρονική περίοδος συλλογής των δειγμάτων αφορούσε στους μήνες Σεπτέμβριο και Οκτώβριο του έτους 2016. Στον πίνακα 2 αναφέρονται τα είδη, ο αριθμός, η προέλευση αλίευσης και τα σωματομετρικά χαρακτηριστικά των αλιευμάτων που συλλέχθηκαν.

Πίνακας 2: Είδη, αριθμός, προέλευση και σωματομετρικά χαρακτηριστικά των αλιευμάτων

Ημερ/νία	Κοινή Ελληνική ονομασία	Κοινή Αγγλική ονομασία	Είδος, Επιστημονική ονομασία	Προέλευση	Αριθμός	Μέσο Μεσου-ραίο Μήκος (cm)	Μέσο Βάρος (gr)
11/9/2016	Ροφός	Dusky grouper	<i>Epinephelus marginatus</i> (Lowe, 1834)	Κάσος	3	-	1200
11/9/2016	Μαγιάτικο	Greater amberjack	<i>Seriola dumerili</i> (Risso 1810)	Λέρος	2	38	792
11/9/2016	Ροφός	Dusky grouper	<i>Epinephelus marginatus</i> (Lowe, 1834)	Πρασονήσι Ρόδου	2	40,8	1880
11/9/2016	Σκάρος	Parrotfish	<i>Sparisoma cretense</i> (Linnaeus, 1758)	Πρασονήσι Ρόδου	6	16	80
11/9/2016	Γόπα	Bogue	<i>Boops boops</i> (Linnaeus, 1758)	Πρασονήσι Ρόδου	10	17	89,5
11/9/2016	Πέρκα	Painted Comber	<i>Serranus scriba</i> (Linnaeus, 1758)	Κάμειρος Ρόδου	4	19	175
11/9/2016	Χάνος	Comber	<i>Serranus cabrilla</i> (Linnaeus, 1758)	Κάμειρος Ρόδου	5	17	58
11/9/2016	Σκορπίνα	Red Scorpionfish	<i>Scorpaena scrofa</i> (Linnaeus, 1758)	Κάρπαθος	3	18,3	120

11/9/2016	Σκάρος	Parrotfish	<i>Sparisoma cretense</i> (Linnaeus, 1758)	Κάρπαθος	3	15,5	84
11/9/2016	Τσιπούρα	Gilthead seabream	<i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758)	Νησίδα Μακρύ	4	15	52
11/9/2016	Λαβράκι	European seabass	<i>Dicentrarchus labrax</i> (Linnaeus, 1758)	Νησίδα Μακρύ	4	17	145
14/9/2016	Γλώσσα	Common sole	<i>Solea solea</i> (Linnaeus, 1758)	Κρήτη	5	10	-
14/9/2016	Γερμανός	Dusky spinefoot	<i>Siganos luridus</i> (Rüppell, 1829)	Κρήτη	5	14	81
14/9/2016	Σκαρμός	Atlantic lizardfish	<i>Synodus saurus</i> (Linnaeus, 1758)	Κρήτη	4	21	174
14/9/2016	Κακαρέλλος	Common two-banded seabream	<i>Diplodus vulgaris</i> (Geoffroy Saint-Hilaire, 1817)	Κρήτη	10	11	104
14/9/2016	Σκυλοπαράκι	Lesser spotted dogfish	<i>Scyliorhinus canicula</i> (Linnaeus, 1758)	Κρήτη	5	42	208
14/9/2016	Ράτζα	Brown ray	<i>Raja miraletus</i> Linnaeus, 1758	Κρήτη	5	-	-
14/9/2016	Γάρος	Forkbeard	<i>Phycis phycis</i> (Linnaeus, 1766)	Κρήτη	5	20,5	98
14/9/2016	Ψάρι πιλότος	Pilotfish	<i>Naucrates ductor</i> (Linnaeus, 1758)	Κρήτη	5	19	168
14/9/2016	Λαγοκέφαλος	Silver-cheeked Toadfish	<i>Lagocephalus Sceleratus</i> (Gmelin, 1789)	Κρήτη	4	28	600
14/9/2016	Μουσμούλι	Axillary Seabream	<i>Pagellus acarne</i> (Risso, 1827)	Κρήτη	7	16	62
14/9/2016	Μπαρμπούνι	Surmullet	<i>Mullus surmuletus</i> Linnaeus, 1758	Κρήτη	6	15	60
14/9/2016	Χάνος	Comber	<i>Serranus cabrilla</i> (Linnaeus, 1758)	Κρήτη	5	19	64
14/9/2016	Χελιδονόψαρο	Flying gurnard	<i>Dactylopterus volitans</i> (Linnaeus, 1758)	Κρήτη	3	23	252
14/9/2016	Καπόνι	Spiny gurnard	<i>Lepidotrigla dieuzeidei</i> Blanc & Hureau, 1973	Κρήτη	5	17,4	70
					120		

Τα αλιεύματα μεταφέρονταν την ίδια μέρα από τη συλλογή τους μέσα σε κλειστούς περιέκτες υπό ψύξη στο εργαστήριο Ιχθυολογίας – Ιχθυοπαθολογίας, όπου άμεσα πραγματοποιούνταν εξαγωγή των οφθαλμών και του εγκεφάλου τους με άσηπτες συνθήκες.

Τα όργανα που εξάγονταν ομαδοποιούνταν ανά είδος αλιεύματος και οργάνου, τοποθετούνταν σε πλαστικά αποστειρωμένα φιαλίδια και αποθηκεύονταν τους -80° C. Συνολικά αναλύθηκαν 25 ομαδοποιημένα δείγματα εγκεφάλου από 120 αλιεύματα που αντιστοιχούσαν σε 22 είδη και 9 οικογένειες ψαριών.

2.2 Εγκαταστάσεις και συνθήκες διατήρησης πειραματικού πληθυσμού

Η προετοιμασία και η εκτέλεση των πειραμάτων του δεύτερου σκέλους της έρευνας πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Τμήματος Κτηνιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στην Καρδίτσα.

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 8 γυάλινα ενυδρεία χωρητικότητας 180 λίτρων. Η κυκλοφορία του νερού γινόταν μέσω ατομικού, κλειστού κυκλώματος, προκειμένου να αποφευχθεί η εξάπλωση της μόλυνσης μέσω του νερού και να ελεγχθεί πλήρως η περιεκτικότητά του σε άλατα. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν ύδρευσης, αποχλωριωμένο και για την επίτευξη τεχνητής αλατότητας προστέθηκαν άλατα εμπορίου.

Καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής μόλυνσης η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή στους 27 °C με τη βοήθεια θερμοαντιστάσεων. Η οξυγόνωσή τους γινόταν με αεραντλίες, ατομικές για κάθε ενυδρείο.

Πριν τη μεταφορά του πειραματικού πληθυσμού, τα ενυδρεία παρέμειναν πληρωμένα με νερό αλατότητας 33‰ για δύο μήνες, ώστε να αναπτυχθούν μικροοργανισμοί του γένους *Nitrosomonas spp.* και *Nitrobacter spp.*, που κρίνονται απαραίτητοι για την επίτευξη ισορροπίας στο βιολογικό φίλτρο κατά την παραμονή των ψαριών. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε στα ενυδρεία ο πειραματικός πληθυσμός και αφέθηκε να εγκλιματιστεί για περίπου δεκαπέντε ημέρες, ώστε να αποκατασταθεί η προκληθείσα καταπόνηση (στρες) των λαβρακιών λόγω μεταφοράς και αλλαγής περιβάλλοντος και να επιτευχθεί η επιθυμητή αύξηση του σωματικού τους βάρους.

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε εκτροφή του πληθυσμού με τα σιτηρέσια που περιγράφονται κατωτέρω για 2,5 μήνες. Οι συνθήκες εκτροφής των λαβρακιών ήταν: οξυγόνο 7 mg/μl, αλατότητα 33‰ και θερμοκρασία 24 °C.

Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος διενεργούνταν δειγματοληψίες νερού από τα ενυδρεία και καταγραφή της θερμοκρασίας, της αλατότητας και της περιεκτικότητας σε

οξυγόνο. Δεν παρατηρήθηκαν θνησιμότητες κατά την περίοδο εγκλιματισμού των ψαριών.

2.3 Πειραματικός πληθυσμός

Το πειραματικό πρωτόκολλο του δεύτερου σκέλους εκτελέστηκε σε λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) αρχικού σωματικού βάρους 8 gr, που προέρχονταν από ιχθυογεννητικό σταθμό από την περιοχή της Ηγουμενίτσας και ήταν εμβολιασμένα με τα συνήθη πρωτόκολλα. Τα λαβράκια τοποθετήθηκαν ισόποσα σε 8 ενυδρεία κλειστού κυκλώματος. Κατά τη διάρκεια εγκλιματισμού του πειραματικού πληθυσμού, ελήφθησαν έξι άτομα από κάθε ενυδρείο για τη διενέργεια μικροβιολογικών, παρασιτολογικών και ιολογικών εξετάσεων, τα αποτελέσματα των οποίων κατέδειξαν την απουσία παθογόνων παραγόντων. Μετά το πέρας της περιόδου εγκλιματισμού και τη διενέργεια ιχθυοπαθολογικών εξετάσεων, ο πειραματικός πληθυσμός (n=320) διατράφηκε για 10 εβδομάδες με 3 διαφορετικά σιτηρέσια. Ειδικότερα, ο πληθυσμός τεσσάρων ενυδρείων διατράφηκε με σιτηρέσιο εμπορίου, ο πληθυσμός δύο ενυδρείων διατράφηκε με σιτηρέσιο εμπορίου εμπλουτισμένο με 1000 ppm διάλυμα αιθέριου ελαίου ρίγανης, ενώ ο πληθυσμός των υπόλοιπων δύο ενυδρείων με σιτηρέσιο εμπορίου εμπλουτισμένο με 2000 ppm διάλυμα αιθέριου ελαίου ρίγανης. Η ημερήσια ποσότητα τροφής που χορηγούνταν ανερχόταν στο 2% της βιομάζας των ιχθυδίων σε μία εφάπαξ χορήγηση, ενώ το μέσο βάρος των λαβρακιών μετά την ολοκλήρωση 10 εβδομάδων εκτροφής τους ανήλθε στα 30 gr. Ακολούθησε ενοφθαλμισμός των ιχθυδίων με ιό RGNNV, με εξαίρεση τον πληθυσμό δύο ενυδρείων που διατράφηκε με σιτηρέσιο εμπορίου και αξιοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας.

2.4 Σιτηρέσιο εκτροφής πειραματικού πληθυσμού

Για την εκτροφή των λαβρακιών χρησιμοποιήθηκε τροφή εμπορίου σε μορφή κόκκων (pellets), κατάλληλη για το είδος και την ηλικία των ιχθυδίων. Για τον εμπλουτισμό της με αιθέριο έλαιο ρίγανης ακολουθήθηκε η κατωτέρω διαδικασία: Αρχικά, διενεργείτο αραίωση του αιθέριου ελαίου ρίγανης σε ιχθυέλαιο σε αναλογία 1/10. Στη συνέχεια προστίθεντο 1 ή 2 ml του διαλύματος σε 1 kg τροφής εμπορίου για να επιτευχθεί συγκέντρωση 1000 και 2000 ppm αντίστοιχα. Ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση του μείγματος σε αδιαφανείς πλαστικούς περιέκτες έως ότου επιτευχθεί ομοιόμορφη κατανομή του διαλύματος. Η ανωτέρω διαδικασία πραγματοποιούνταν κάθε εβδομάδα για χρονικό διάστημα 10 εβδομάδων.

2.5 Ιός πειραματικής μόλυνσης

Για τον ενοφθαλμισμό των λαβρακιών, χρησιμοποιήθηκε ένα στέλεχος RGNNV, που απομονώθηκε από εκτρεφόμενα λαβράκια (*Dicentrarchus labrax*) με σαφή κλινικά συμπτώματα ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας, προερχόμενα από ελληνικές υδατοκαλλιέργειες στην περιοχή του Αλιβερίου και του Αστακού. Ο ιός απομονώθηκε και καλλιεργήθηκε στην κυτταρική σειρά SSN-1. Το ενοφθάλμισμα του ιού που χρησιμοποιήθηκε στις πειραματικές δοκιμές ήταν αραιωμένο σε PBS υπερκείμενο υγρό κυτταροκαλλιέργειας που περιείχε ιικά σωματίδια και είχε τίτλο 10^5 TCID₅₀/ml. Η απομόνωση, τιτλοποίηση και παραγωγή των ιικών σωματιδίων πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με το εργαστήριο Κυτταρικής Ανοσολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ, στα πλαίσια του έργου MIS375267 της δράσης «ΘΑΛΗΣ – Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», ΕΣΠΑ 2007-2013.

2.6 Πρωτόκολλο πειραματικής μόλυνσης και δειγματοληψιών

Ο ενοφθαλμισμός του πειραματικού πληθυσμού με ιό RGNNV διενεργήθηκε κατόπιν ενδομυϊκής χορήγησης 0,5 ml διαλύματος του ιού, συγκέντρωσης 10^5 TCID₅₀/ml στην περιοχή κάτω από το μέσο του ραχιαίου πτερυγίου. Η διαδικασία αυτή εφαρμόστηκε στα ιχθύδια των δύο εκ των τεσσάρων ενυδρείων που διατράφηκαν με τροφή εμπορίου (ομάδα θετικών μαρτύρων), των δύο ενυδρείων που διατράφηκαν με σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με 1000ppm διάλυμα αιθέριου ελαίου ρίγανης (ομάδα 1000ppm) και των δύο ενυδρείων που διατράφηκαν με σιτηρέσιο εμπλουτισμένο με 2000ppm διάλυμα αιθέριου ελαίου ρίγανης (ομάδα 2000ppm). Στα ιχθύδια των υπόλοιπων δύο ενυδρείων που διατράφηκαν με τροφή εμπορίου (ομάδα αρνητικών μαρτύρων), χορηγήθηκε αντι για ιικό διάλυμα, διάλυμα PBS.

Πριν και μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού στον πειραματικό πληθυσμό πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες ιχθυδίων από όλα τα ενυδρεία, για τη διενέργεια μοριακών εξετάσεων. Τα δείγματα λαμβάνονταν τυχαία από ζωντανά (υγιή και νοσούντα) ψάρια. Τα χρονικά σημεία των δειγματοληψιών και ο αριθμός των συλλεχθέντων ψαριών είχαν ως εξής:

Δύο άτομα από κάθε ενυδρείο (τέσσερα ανά ομάδα) συλλέχθηκαν ακριβώς πριν τον ενοφθαλμισμό του ιού και έπειτα σε 6, 24, 48, 72, 96 ώρες, καθώς και σε 7 και 14 ημέρες μετά τον ενοφθαλμισμό με τον ιό RGNNV. Από κάθε ψάρι εξαγονταν με χειρουργικό τρόπο, κατόπιν αναισθησίας με Tricaine Methanosulfonate, ο οφθαλμός και ο εγκέφαλος για τον προσδιορισμό του ιικού φορτίου. Για την αποφυγή επιμολύνσεων, χρησιμοποιούνταν διαφορετικά αποστειρωμένα εργαλεία ανά άτομο. Οι ιστοί τοποθετούνταν σε ξεχωριστούς αποστειρωμένους πλαστικούς μικροσωλήνες και ψύχονταν άμεσα στους -196°C σε υγρό άζωτο (snap frozen samples), ώστε να καθίσταντο εφικτή η βέλτιστη διατήρηση του ιικού φορτίου. Εν συνεχεία, τα δείγματα αποθηκεύονταν στους -80 °C.

Επιπροσθέτως, από κάθε ψάρι συλλέγονταν και άλλα βιολογικά δείγματα (περιφερικό αίμα με αντιπηκτικό, σπλήνα, ήπαρ, κεφαλή πρόνεφρου) για τις ανάγκες προσδιορισμού ανοσολογικών και πρωτεϊνικών βιοδεικτών που δεν πραγματεύεται η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή.

2.7 Εκχύλιση ολικού RNA

2.7.1 Ιστοί που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση ολικού RNA

Ο εγκέφαλος των συλλεχθέντων δειγμάτων του πρώτου και δεύτερου σκέλους των πειραματισμών αξιοποιήθηκε για απομόνωση ολικού RNA με σκοπό την ανίχνευση γενώματος Betanoda-ιών.

2.7.2 Αντιδραστήρια εκχύλισης ολικού RNA

Η εκχύλιση ολικού RNA από τους εγκεφάλους των ψαριών επιτεύχθηκε με τη χρήση των εξής αντιδραστηρίων: «διάλυμα λύσης 1» (“Lysis buffer 1”), TCEP, RNA carrier, «διάλυμα λύσης 2» (“Lysis buffer 2”), χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη (24: 1), απόλυτη αιθανόλη, «διάλυμα πλύσης 1» (“Wash buffer 1”), «διάλυμα πλύσης 2’ (“Wash buffer 2”) και νερό κατεργασμένο με DEPC. Το «διάλυμα λύσης 1», που χρησιμοποιούνταν για τη λύση των ιστών, περιείχε: 5 M θειοκυανιούχου γουανιδίνης-GuITC, 25 mM EDTA, 1% N-Lauroylsarcosine, 2% Triton X-100, 25 mM κιτρικού νατρίου και 25 mM διαλύματος φωσφορικών αλάτων (από ένα stock 1 M διαλύματος φωσφορικών αλάτων που περιείχε: 6,41 ml 2 M NaH₂PO₄ και 13,59 ml 2 M Na₂HPO₄ και H₂O κατεργασμένο με DEPC (Applichem, Darmstadt, Germany) μέχρι την επίτευξη τελικού όγκου 40 ml).

Το «διάλυμα λύσης 2» παρασκευαζόταν με την προσθήκη 152.5 gr υδροχλωρικής γουανιδίνης-GuHCl, 31.25 ml διαλύματος οξικού οξέως 2 M, pH 3.8 (το διάλυμα οξικού οξέος περιείχε 9.4 ml κρυσταλλικού οξικού οξέος, 4.9 gr τριυδρικού οξικού νατρίου και νερό κατεργασμένο με DEPC μέχρι τη συμπλήρωση 100 ml) και φενόλης κορεσμένης σε νερό, pH 4 μέχρι την συμπλήρωση 500 ml.

Το «διάλυμα πλύσης 1», που χρησιμοποιούνταν στην έκπλυση των μεμβρανών, αποτελούνταν από 4 M υδροχλωρικής γουανιδίνης-GuHCl, 50 mM Tris-HCl, pH 6.6 και 60% αιθανόλη.

Το «διάλυμα πλύσης 2» περιείχε 2 mM Tris-υδροχλώριο (Tris-HCl) pH 6.6, 20 mM χλωριούχο νάτριο (NaCl) και 80% αιθανόλη.

2.7.3 Μέθοδος εκχύλισης ολικού RNA (RNA extraction method)

Για την εξαγωγή ολικού mRNA από τους ιστούς των ψαριών ακολουθήθηκε πρωτόκολλο που αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε επιτυχώς σε συνεργασία με το Διαγνωστικό Εργαστήριο της Κτηνιατρικής Σχολής του Α.Π.Θ, στα πλαίσια του έργου MIS 375267 της δράσης «ΘΑΛΗΣ - Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», ΕΣΠΑ 2007 - 2013, το οποίο παρουσιάζεται αναλυτικά κατωτέρω.

Στα δείγματα προστίθεντο «διάλυμα λύσης 1» σε αναλογία 1/5 (gr ιστού/ ml δ/τος) και διενεργούνταν μηχανική ομογενοποίηση. Εν συνεχεία, 600 ml ομογενοποιημένου μεταγγίζονταν σε αποστειρωμένο μικροσωλήνα όπου προστίθεντο 800 ml «διαλύματος λύσης 2» και 250 ml χλωροφόρμιου-ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1. Ακολουθούσε έντονη ανάδευση του μικροσωλήνα για 10 sec και επώασή του για 30 min στους -200°C . Έπειτα διενεργούνταν φυγοκέντρηση ($16.000 \times g$) για 15 min στους 4°C και συλλογή 500 ml από την υπερκείμενη υδατική φάση σε νέο μικροσωλήνα, όπου προστίθεντο ίσος όγκος αιθανόλης. Το λύμα αναδεύονταν για 5

sec με τη βοήθεια vortex και 800 μl αυτού μεταφέρονταν σε στήλη που έφερε διηθητική μεμβράνη διοξειδίου του πυριτίου (FT-2.0 Filter-Tube Spin-Column System, G. Kisker, Steinfurt, Germany), κατόπιν διαβροχής της μεμβράνης με αιθανόλη. Οι στήλες φυγοκεντρούνταν με ταχύτητα $8000 \times g$ για 5 min για την απομάκρυνση των προσμίξεων και την προσρόφηση του mRNA στη μεμβράνη. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, απορρίπτονταν ο μικροσωλήνας και ακολουθούσαν διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης με το «διάλυμα πλύσης 1» (Wash buffer 1) και το «διάλυμα πλύσης 2» (Wash buffer 2). Η διαδικασία της έκπλυσης περιελάμβανε αρχικά την προσθήκη 700 μl «διαλύματος πλύσης 1» στη στήλη και τη φυγοκέντρωσή της ($8000 \times g$) για 1 min. Έπειτα, την προσθήκη 500 μl «διαλύματος πλύσης 2», ακολουθούμενη από φυγοκέντρωση ($12.000 \times g$) για ένα λεπτό και την προσθήκη 400 μl «διαλύματος πλύσης 2» ακολουθούμενη από φυγοκέντρωση ($16.000 \times g$) για 6 λεπτά. Σε όλα τα στάδια της διαδικασίας της έκπλυσης, μετά το πέρας κάθε φυγοκέντρωσης απορρίπτονταν ο μικροσωλήνας που περιείχε το έκπλυμα. Τέλος, η μεμβράνη τοποθετούνταν σε πλαστικούς αποστειρωμένους μικροσωλήνες, χωρητικότητας 1,5 ml, όπου διενεργούνταν η διαδικασία της έκλυσης του RNA, με την προσθήκη 40 μl νερού κατεργασμένου με DEPC, προθερμασμένου στους 80°C.

2.8 Real-time PCR ενός σταδίου για την ανίχνευση του ιού Noda

2.8.1 Εκκινητές και φθορίζον ολιγονουκλεοτίδιο «Taqman probe»

Οι εκκινητές και το φθορίζον ολιγονουκλεοτίδιο TaqMan probe που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων σχεδιάστηκαν σε συνεργασία με το Διαγνωστικό Εργαστήριο της Κτηνιατρικής του ΑΠΘ με βάση την επιλογή εξελικτικά συντηρημένων γονιδιακών περιοχών από δημοσιευμένες RNA-2 αλληλουχίες Noda-ιών. Οι εκκινητές διαπιστώθηκε ότι είχαν μεγάλο εύρος ανίχνευσης. Ο TaqMan probe

σημάνθηκε με 6-καρβοξυφλουορεσκεΐνη (6-carboxyfluorescein, 6-FAM) στο 5'-άκρο και με ZNA-4- ECLIPSE Quencher στο 3'-άκρο (Metabion International, Martinsried, Γερμανία) (Πίνακας 3). Τα ZNAs είναι ολιγονουκλεοτίδια συζευγμένα με κατιονικές μονάδες σπερμίνης που αυξάνουν τη συγγένεια στόχου και την Tm του ιχνηλάτη.

Πίνακας 3: Εκκινητές και ιχνηλάτες που χρησιμοποιήθηκαν στη δοκιμή real-time PCR για την ανίχνευση *Betanoda*-ιών

Εκκινητές/ Ιχνηλάτης	Αλληλουχία 5' – 3'	Συγκέντρωση	Tm
Noda Up	CAC TGG AGT TYG AAA	0,4μM	67.2
	TTC AGC CAA TGT		
Noda Do	CTT TCC CAC CAT TTG	0,4μM	67.3
	GCR ACG AC		
TaqMan Probe	Fam-TGT CAG TTG GAT CAG GCA GGA-ZNA-4- Eclipse	0,2μM	75
Y = C, T; R = A, G; M = A, C.			

2.8.2 Δοκιμασία real-time PCR ενός σταδίου

Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα στον θερμοκυκλοποιητή CFX96 Touch™ Real-Time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Το διάλυμα της αντίδρασης τοποθετούνταν σε πλάκες πολυπροπυλενίου (polypropylene plate), χωρητικότητας 96 θέσεων. Ο τελικός όγκος του διαλύματος αντίδρασης ήταν 25 μl αποτελούμενος από 0,2 mM από κάθε dNTP, 1 mM DTT, 1 μονάδα Superscript™ III Rnase H–RT, 1,5 mM MgSO₄ (Invitrogen-Life Technologies,

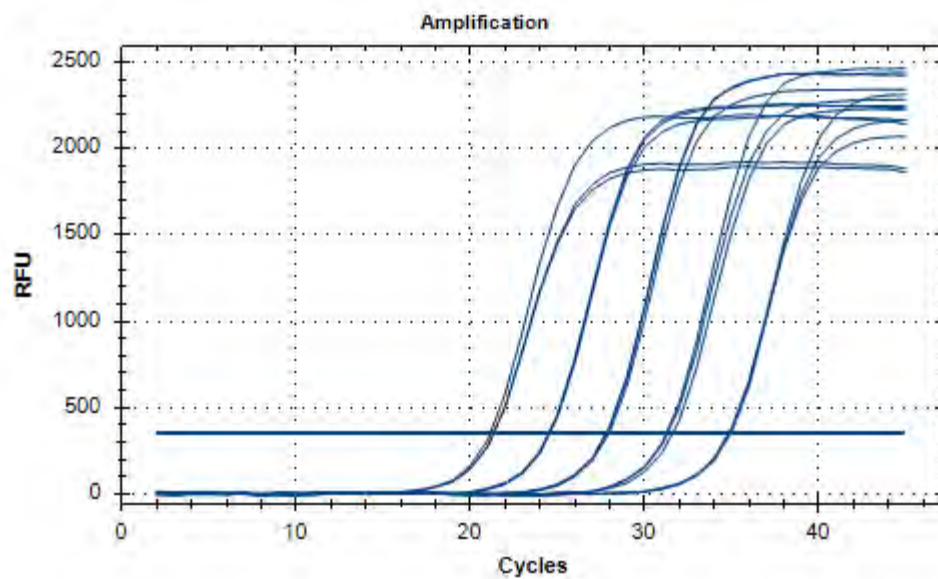
Groningen, The Netherlands), 3 μονάδες HotStartTaq DNA polymerase (Qiagen, Hilden, Germany), 0,4 μ M ανοδικού εκκινητή, 0,4 μ M καθοδικού εκκινητή, 0,2 mM σηματοδοτικού ολιγονουκλεοτιδίου TaqMan, το διάλυμα αντίδρασης [F-517L Optimized Detergent-freeDyNAzyme™ EXT Buffer (50 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 15 mM (NH₄)₂SO₄) (Finnzymes, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland)] και το εξεταζόμενο δείγμα RNA.

Το προφίλ της αντίδρασης περιελάμβανε το στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής του εκμαγείου σε θερμοκρασία 55⁰ C για 20 λεπτά, ακολουθούμενο από το στάδιο θερμικής αποδιάταξης του DNA/ενεργοποίησης της πολυμεράσης στους 95⁰ C για 15 λεπτά και 45 επαναλαμβανόμενους κύκλους θερμικής αποδιάταξης στους 95⁰ C για 30 δευτερόλεπτα και υβριδισμού/επιμήκυνσης των εκκινητών στους 59⁰ C για 50 δευτερόλεπτα.

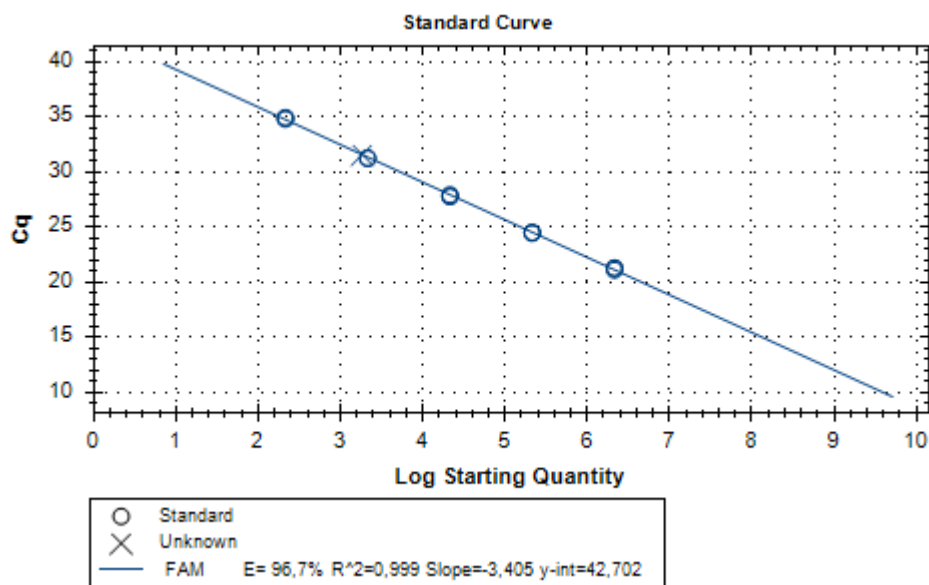
Η ανάλυση των δεδομένων φθορισμού διενεργούνταν με τη χρήση του λογισμικού CFX™ (Version 3.0, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

2.9 Πρότυπη καμπύλη τιτλοποίησης

Προκειμένου να καταστεί εφικτός ο ποσοτικός προσδιορισμός του ιικού φορτίου και να εκτιμηθεί η αναλυτική ευαισθησία και το εύρος ποσοτικοποίησης της δοκιμής real-time PCR, έγιναν διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις RNA αντιγράφων RGNNV γνωστής συγκέντρωσης οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμή real-time PCR ενός σταδίου για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Η εξίσωση της real-time PCR που προέκυψε από τον έλεγχο των δεκαδικών αραιώσεων των ιικών αντιγράφων RNA ήταν $y=10^{((42,702-x)/3,405)}$ και ο συντελεστής συσχέτισης R^2 ήταν 0.999. Στα γραφήματα που ακολουθούν απεικονίζονται οι καμπύλες φθορισμού που προέκυψαν από την ανάλυση των διαδοχικών αραιώσεων του ιού αναφοράς και η πρότυπη καμπύλη τιτλοποίησης του ιού (γράφημα 1, γράφημα 2).



Γράφημα 1: Καμπύλες φθορισμού που προέκυψαν από τις υποδεκαπλάσιες αραιώσεις ιού-αναφοράς



Γράφημα 2: Πρότυπη καμπύλη τιτλοποίησης του ιού

2.10 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πακέτο Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, Illinois, Windows ver. 20.0) και οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές για $P < 0,05$. Ειδικότερα, υπολογίστηκε το ημερήσιο ποσοστό θνησιμότητας και το συσσωρευτικό ποσοστό θνησιμότητας για κάθε ομάδα ενοφθαλμισμού και αποτυπώθηκε με περιγραφική στατιστική ανάλυση η εξέλιξη των παραμέτρων αυτών στη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Ο υπολογισμός των εν λόγω ποσοστών έγινε μετά από αφαίρεση των ατόμων που προορίζονταν για τη διενέργεια εξετάσεων από τον πειραματικό πληθυσμό των ομάδων. Επιπλέον, διενεργήθηκε περιγραφική στατιστική ανάλυση των τίτλων ανά ομάδα ενοφθαλμισμού. Στο παράρτημα παρατίθενται αναλυτικοί πίνακες που εμπεριέχουν τον μέσο όρο, τη διάμεσο και την τυπική απόκλιση των ανωτέρω παραμέτρων. Επιλέχθηκαν κατάλληλες στατιστικές δοκιμές ώστε να εξακριβωθεί η ύπαρξη στατιστικά σημαντικών διαφορών. Χρησιμοποιήθηκαν τα τεστ Kolmogorov-Smirnov και Shapiro – Wilk για τον έλεγχο της κανονικότητας, το τεστ Levene για τον έλεγχο της ομοιογένειας και η δοκιμασία Mauchy για τον έλεγχο της σφαιρικότητας. Για τη σύγκριση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (One-way ANOVA) και ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (repeated-measures ANOVA), ενώ όπου διαπιστώθηκαν διαφορές διενεργήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις των μέσων όρων ανά ζεύγη (Bonferoni post hoc test).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Πείραμα 1^ο

3.1.1 Ανίχνευση ιού *Noda* σε αλιεύματα του Νοτίου Αιγαίου

Όπως προκύπτει από την ανάλυση των ομαδοποιημένων δειγμάτων με real-time PCR, Betanoda-ιοί ανιχνεύθηκαν σε 1 από τα 22 είδη που εξετάστηκαν. Ειδικότερα, ο ιός ανιχνεύθηκε σε άτομα του είδους *Solea solea*, αλιευμένα από τα θαλάσσια ύδατα της Κρήτης. Στον πίνακα 4 παρατίθενται τα αποτελέσματα της ανάλυσης με real-time PCR.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα ανάλυσης real-time PCR

α/α	Κοινή ελληνική ονομασία	Επιστημονική ονομασία	Αριθμός ατόμων	Αριθμός ομαδοπ. δειγμάτων	Αριθμός θετικών δειγμάτων
1	Γάρος	<i>Phycis phycis</i>	5	1	0
2	Γερμανός	<i>Siganus luridus</i>	5	1	0
3	Γόπα	<i>Boops boops</i>	10	1	0
4	Γλώσσα*	<i>Solea solea</i>	5	1	1
5	Κακαρέλλος	<i>Diplodus vulgaris</i>	10	1	0
6	Καπόνι	<i>Lepidotrigla dieuzeidei</i>	5	1	0
7	Λαβράκι	<i>Dicentrarchus labrax</i>	4	1	0
8	Λαγοκέφαλος	<i>Lagocephalus sceleratus</i>	4	1	0
9	Μαγιάτικο	<i>Seriola dumerili</i>	2	1	0
10	Μουσμούλι	<i>Pagellus acarne</i>	7	1	0
11	Μπαρμπούνι	<i>Mullus surmuletus</i>	6	1	0
12	Πέρκα	<i>Serranus scriba</i>	4	1	0
13	Ράτζα	<i>Raja miraletus</i>	5	1	0
14	Ροφός	<i>Epinephelus marginatus</i>	5	2	0
15	Σκαρμός	<i>Synodus saurus</i>	4	1	0
16	Σκάρος	<i>Sparisoma cretense</i>	9	2	0
17	Σκορπίνα	<i>Scorpaena scrofa</i>	3	1	0
18	Σκυλοψαράκι	<i>Scylliorhinus canicula</i>	5	1	0
19	Τσιπούρα	<i>Sparus aurata</i>	4	1	0
20	Χάνος	<i>Serranus cabrilla</i>	10	2	0
21	Χελιδονοψαρο	<i>Dactylopterus volitans</i>	3	1	0
22	Ψάρι Πιλότος	<i>Naucrates ductor</i>	5	1	0

*με έντονη γραφή επισημαίνονται τα είδη στα οποία ανιχνεύθηκαν *Noda*-ιοί

Η τιμή του κύκλου κατώφλι του δείγματος ήταν 25,49. Η αλληλούχηση και φυλογενετική ανάλυση τμήματος του γονιδίου της πολυμεράσης (pol) και της καψιδιακής πρωτεΐνης (cp) του στελέχους, που διενεργήθηκε σε συνεργασία με το Διαγνωστικό Εργαστήριο του Τμήματος Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ., κατέδειξαν ότι ο ιός ανήκε στον γενότυπο RGNNV.

3.2 Πείραμα 2^ο

3.2.1 Κλινική εικόνα ιχθυδίων μετά τον ενοφθαλμισμό

Τυπική κλινική συμπτωματολογία ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας των ψαριών εκδηλώθηκε στον πειραματικό πληθυσμό των τριών ομάδων (θετικών μαρτύρων, 1000 ppm, 2000 ppm) που μολύνθηκαν με τον ιό RGNNV. Κλινικά συμπτώματα δεν διαπιστώθηκαν στην ομάδα των αρνητικών μαρτύρων.

Η κλινική εικόνα της νόσου χαρακτηριζόταν από την εμφάνιση ανορεξίας, ληθαργικότητας, σκούρου χρωματισμού του δέρματος, απότομης διέγερσης μετά την πρόκληση καταπόνησης, παραμονής στον πυθμένα ή την επιφάνεια του ενυδρείου σε πλάγια θέση ή ανάσκελα για μεγάλο χρονικό διάστημα και διαταραχών στην πλεύση όπως παρουσία σπειροειδούς, κυκλικής, κάθετης και πλάγιας κολύμβησης.

Θνησιμότητα διαπιστώθηκε και στις τρεις πειραματικές ομάδες που μολύνθηκαν με τον ιό RGNNV. Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται οι απώλειες κάθε ομάδας από την ημέρα του ενοφθαλμισμού του ιού έως και την 13^η ημέρα, κατά την οποία ολοκληρώθηκε το πείραμα.

Πίνακας 5: θνησιμότητα λαβρακιών ανά πειραματική ομάδα

	Χρονικά σημεία time points	Ομάδα θετικών μαρτύρων	Ομάδα 1000 ppm	Ομάδα 2000 ppm
	0	-	-	-
	6 h.p.i.*	-	-	-
	1 d.p.i.**	-	-	-
	2 d.p.i.	1	-	-
	3 d.p.i.	-	1	-
	4 d.p.i.	-	-	-
	5 d.p.i.	1	4	-
	6 d.p.i.	10	11	5
	7 d.p.i.	11	8	11
	8 d.p.i.	4	4	2
	9 d.p.i.	2	1	5
*hours per infection	10 d.p.i.	1	-	3
**days per infection	11 d.p.i.	-	-	-
	12 d.p.i.	-	1	2
	13 d.p.i.	2	1	2
		32	31	30

Ειδικότερα, σε κάθε πειραματική ομάδα διαπιστώθηκαν τα εξής:

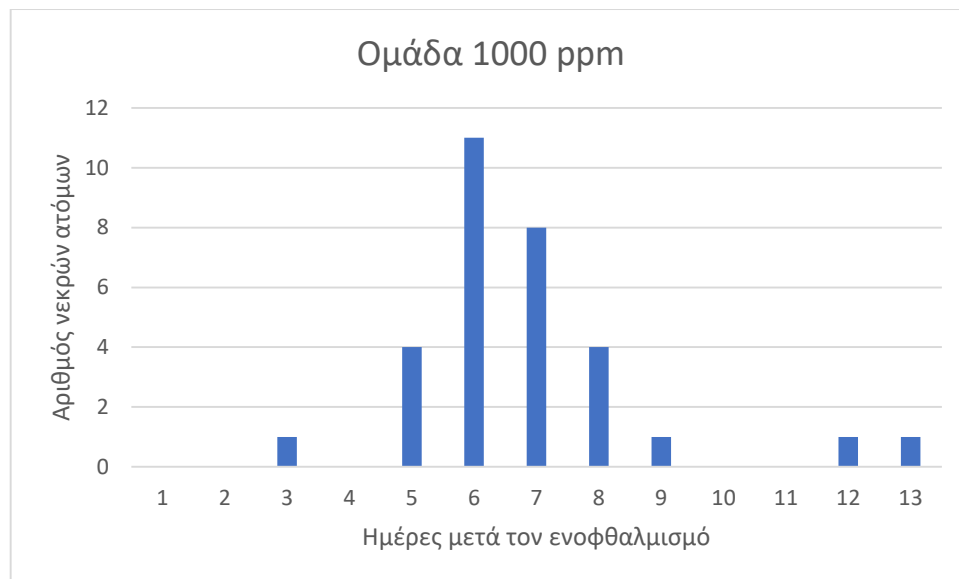
Στην “ομάδα θετικών μαρτύρων” διαπιστώθηκε η πρώτη απώλεια τη δεύτερη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού. Μάλιστα, κατά τη νεκροψία του ιχθυδίου παρατηρήθηκε υπεραιμία στον εγκέφαλο. Ανορεξία, συνεχώς επιδεινούμενη, εμφανίστηκε από τη δεύτερη ημέρα και έπειτα ταυτόχρονα με την παρουσία ληθαργικότητας σε μικρό ποσοστό ιχθυδίων. Νευρικά συμπτώματα παρατηρήθηκαν από την τέταρτη ημέρα και αρχικά περιελάμβαναν στάση ιχθυδίων στον πυθμένα του ενυδρείου σε πλάγια θέση και επιβράδυνση της πλεύσης τους στο νερό. Την πέμπτη ημέρα έκαναν την εμφάνισή τους έντονες διαταραχές στην πλεύση - κυρίως κυκλική και σπειροειδής κολύμβηση- ενώ εντοπίστηκε 1 επιπλέον νεκρό ιχθύδιο. Η ένταση των νευρικών συμπτωμάτων κορυφώθηκε την έκτη και έβδομη ημέρα, όταν παρατηρήθηκαν και οι μεγαλύτερες απώλειες της ομάδας που έφτασαν τα δέκα και έντεκα άτομα αντίστοιχα. Από την όγδοη ημέρα και έπειτα η κλινική συμπτωματολογία έγινε ηπιότερη με σποραδικά

κρούσματα απωλειών, ενώ εξωτερικές ελκωτικές και αιμορραγικές αλλοιώσεις στο δέρμα και τους οφθαλμούς καθίσταντο περισσότερο ορατές. Στο γράφημα 3 απεικονίζεται η εξέλιξη της θνησιμότητας στην “ομάδα θετικών μαρτύρων” σε σχέση με τον αριθμό των απωλειών καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής μόλυνσης.



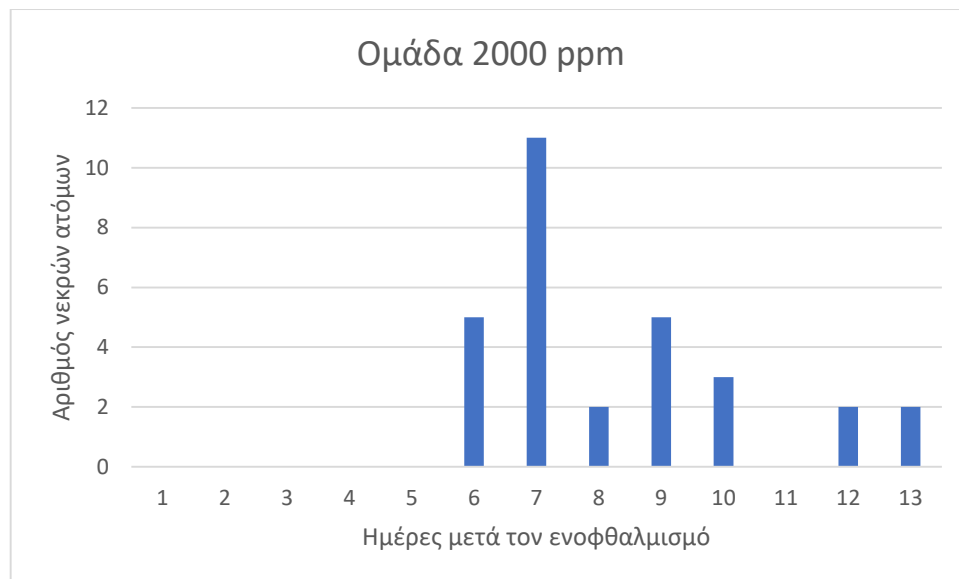
Γράφημα 3: Εξέλιξη της θνησιμότητας στην ομάδα θετικών μαρτύρων

Στην “ομάδα 1000 ppm”, παρατηρήθηκε ανορεξία και νωχελικότητα σε μικρό ποσοστό ιχθυδίων την τρίτη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού, όταν και εκδηλώθηκε η πρώτη απώλεια της ομάδας. Η εκκίνηση των νευρικών συμπτωμάτων έλαβε χώρα την τέταρτη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό και αφορούσε στην εκδήλωση υπερδιέγερσης μετά από καταπόνηση και κολύμβησης σε πλάγια θέση. Κυκλικές κινήσεις, κάθετη και πλάγια πλεύση και σπειροειδής κολύμβηση παρατηρήθηκαν την πέμπτη, έκτη και έβδομη ημέρα, συνοδευόμενα από τις μεγαλύτερες ημερήσιες απώλειες της εν λόγω ομάδας. Τα νευρικά συμπτώματα άρχισαν να υποχωρούν από την όγδοη ημέρα και έπειτα, δίνοντας τη θέση τους στην ανάπτυξη εξωτερικών ελκωτικών αλλοιώσεων. Παράλληλα, παρατηρήθηκε βελτίωση της όρεξης των εναπομεινάντων ιχθυδίων. Στο γράφημα 4 απεικονίζεται η εξέλιξη της θνησιμότητας στην “ομάδα 1000 ppm” σε σχέση με τον αριθμό των απωλειών καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής μόλυνσης.



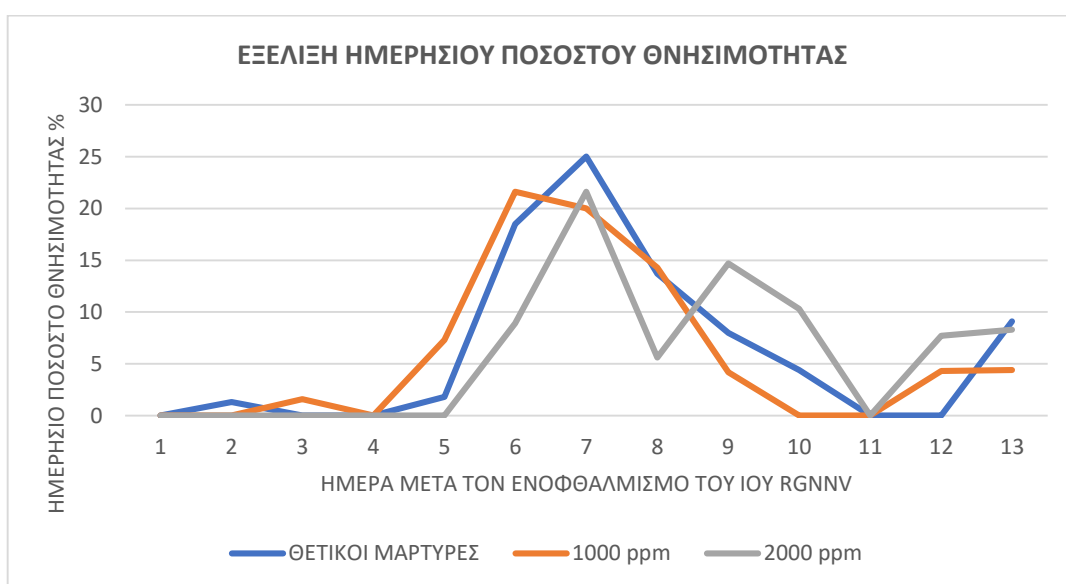
Γράφημα 4: Εξέλιξη της θνησιμότητας στην ομάδα που διατράφηκε με αιθέριο έλαιο ρίγανης, συγκέντρωσης 1000ppm

Στην “ομάδα 2000 ppm” παρατηρήθηκε καθυστερημένη εμφάνιση και ηπιότερη εξέλιξη των κλινικών συμπτωμάτων της νόσου σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Ειδικότερα, ανορεξία και νωχελικότητα παρατηρήθηκε την τέταρτη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού, με τα νευρικά συμπτώματα να εμφανίζονται από την πέμπτη ημέρα και έπειτα. Τα νευρικά συμπτώματα χαρακτηρίζονταν όπως και στις υπόλοιπες πειραματικές ομάδες από υπερδιέγερση μετά από καταπόνηση, πλάγια, κυκλική και σπειροειδή κολύμβηση και παραμονή στον πυθμένα του ενυδρείου ή στην επιφάνεια του νερού σε πλάγια ή κάθετη θέση και σκούρο χρωματισμό του δέρματος. Καθυστέρηση διαπιστώθηκε και στην εκκίνηση των απωλειών (έκτη ημέρα), ενώ σε αυτή την ομάδα καταγράφηκε και η χαμηλότερη συσσωρευτική θνησιμότητα. Και εδώ, μικρού βαθμού παρουσία εξωτερικών αιμορραγικών αλλοιώσεων στην επιφάνεια του δέρματος, που εξελίσσονταν σε διαβρώσεις και έλκη γινόταν ορατή από την όγδοη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό. Στο γράφημα 5 απεικονίζεται η εξέλιξη της θνησιμότητας στην “ομάδα 2000 ppm” σε σχέση με τον αριθμό των απωλειών καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής μόλυνσης.

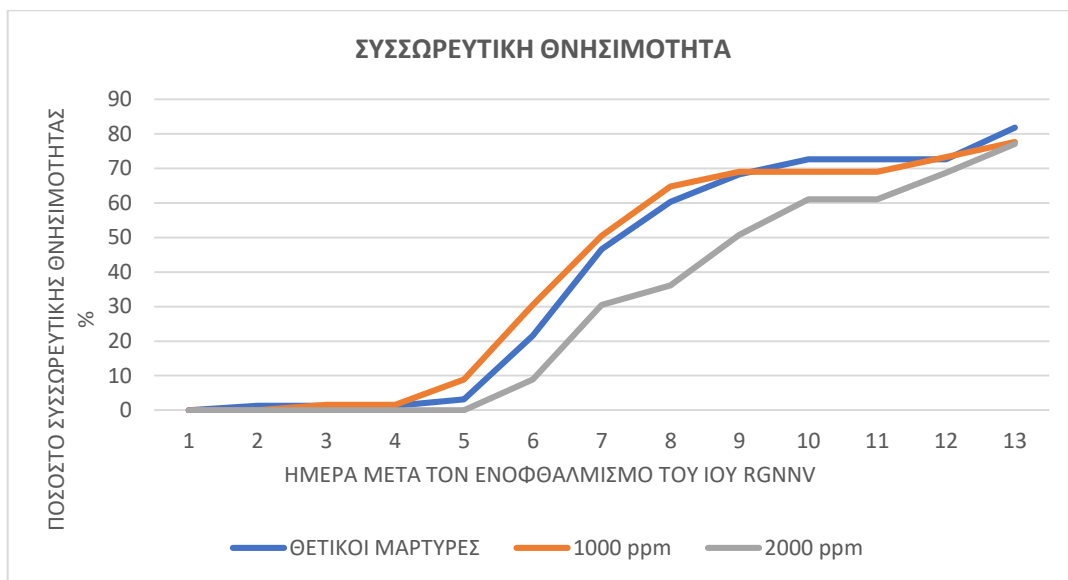


Γράφημα 5: Εξέλιξη της θνησιμότητας στην ομάδα που διατράφηκε με αιθέριο έλαιο ρίγανης, συγκέντρωσης 2000ppm

Στο γραφημα 6 και γράφημα 7 παρατίθεται συγκριτική περιγραφική ανάλυση του ημερήσιου ποσοστού θνησιμότητας και της συσσωρευτικής θνησιμότητας μεταξύ των πειραματικών ομάδων. Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων δεν κατέδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον μέσο όρο του ημερήσιου ποσοστού θνησιμότητας μεταξύ των ομάδων.



Γράφημα 6: Εξέλιξη ημερήσιου ποσοστού θνησιμότητας



Γράφημα 7: Εξέλιξη συσσωρευτικής θνησιμότητας ανά ομάδα

3.2.2 Τίτλοι ιού RGNNV

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δειγμάτων με real-time PCR επιβεβαίωσαν την παρουσία του ιού RGNNV στον εγκέφαλο λαβρακιών της “ομάδας θετικών μαρτύρων”, της “ομάδας 1000 ppm” και της “ομάδας 2000ppm”. Δεν ανευρέθη γονιδίωμα του ιού στα δείγματα της “ομάδας αρνητικών μαρτύρων”.

Ειδικότερα, ο ιός ανιχνεύθηκε στον εγκέφαλο ιχθυδίων της “ομάδας θετικών μαρτύρων” μόλις στις 6 ώρες μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού RGNNV. Στις υπόλοιπες δύο ομάδες, γονιδίωμα του ιού ανευρέθη από τις 24 ώρες και έπειτα. Οι μεγαλύτεροι τίτλοι του ιού παρατηρήθηκαν την έβδομη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό και στις τρεις πειραματικές ομάδες. Την δέκατη τέταρτη ημέρα, ο μέσος όρος των τίτλων του ιού στις τρεις πειραματικές ομάδες ήταν σαφώς χαμηλότερος σε σχέση με αυτόν της έβδομης ημέρας.

Οι τίτλοι του ιού, όπως προέκυψαν μετά τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης τιτλοποίησης παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

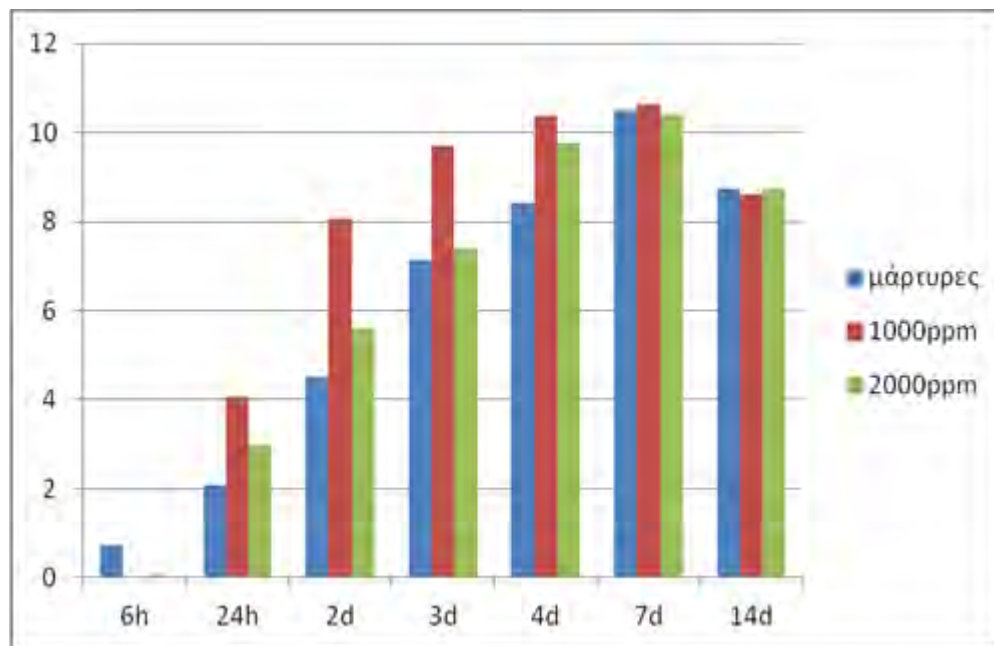
Πίνακας 6: Τίτλοι ιού RRNNV σε δείγματα εγκεφάλου λαβρακιών από κάθε πειραματική ομάδα

	Control	1000ppm	2000ppm
Time points			
6h	0	0	0
	0	0	0
	$10^{2,1}$	0	0
	$10^{2,3}$	0	0
1d	$10^{1,9}$	$10^{4,3}$	$10^{1,6}$
	$10^{2,6}$	$10^{3,8}$	10^5
	$10^{2,6}$	10^4	10^2
	10^4	$10^{4,1}$	$10^{3,3}$
2d	$10^{4,2}$	$10^{7,8}$	$10^{3,6}$
	$10^{4,8}$	$10^{8,4}$	$10^{6,9}$
	$10^{4,6}$	10^8	$10^{6,3}$
	$10^{4,6}$	$10^{8,2}$	10^5
3d	$10^{8,5}$	$10^{10,8}$	10^7
	$10^{8,5}$	10^{10}	$10^{8,6}$
	$10^{7,8}$	$10^{9,2}$	$10^{5,1}$
	$10^{8,3}$	$10^{8,7}$	$10^{8,8}$
4d	$10^{9,6}$	10^{10}	$10^{9,8}$
	$10^{10,4}$	$10^{11,2}$	$10^{9,2}$
	10^9	$10^{9,8}$	$10^{10,2}$
	$10^{4,7}$	$10^{10,5}$	$10^{9,6}$
7d	$10^{10,7}$	$10^{10,8}$	$10^{10,3}$
	$10^{10,6}$	$10^{11,1}$	$10^{10,1}$
	$10^{10,5}$	$10^{10,3}$	$10^{10,5}$
	$10^{10,7}$	$10^{10,6}$	$10^{10,7}$
14d	$10^{8,6}$	$10^{8,3}$	$10^{8,4}$
	$10^{8,8}$	$10^{9,3}$	$10^{8,4}$
	$10^{8,1}$	$10^{9,2}$	$10^{8,4}$
	$10^{8,3}$	$10^{8,8}$	$10^{7,8}$

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων δεν κατέδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον μέσο όρο των τίτλων του ιού μεταξύ των πειραματικών ομάδων (πίνακας 12) . Ειδικότερα, ο μέσος όρος των τίτλων του ιού της “ομάδας θετικών μαρτύρων” δεν διέφερε σημαντικά από τον μέσο όρο των τίτλων της “ομάδας 1000ppm” ($p=0,085$) και από τον μέσο όρο των τίτλων της “ομάδας 2000ppm” ($p=1,000$), ενώ και ο μέσος όρος των τίτλων του ιού μεταξύ της “ομάδας 1000ppm” και αυτών της “ομάδας 2000ppm” δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($p=0,085$).

Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και από τη στατιστική ανάλυση των τίτλων του ιού μεταξύ των ομάδων ανά ημέρα δειγματοληψίας (πίνακας 11, γράφημα 8).

Αναφορικά με την εξέλιξη του μέσου όρου των τίτλων του ιού από την τρίτη έως και την δέκατη τέταρτη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό διαπιστώθηκαν τα εξής: Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τίτλων της τρίτης και της τέταρτης ημέρας ($p=0,507$), της τρίτης και της δέκατης τέταρτης ημέρας ($p=1,000$), της τέταρτης και της έβδομης ημέρας ($p=0,185$), της τέταρτης και της δέκατης τέταρτης ημέρας ($p=0,354$), ενώ παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στους μέσους όρους των τίτλων της τρίτης με αυτούς της έβδομης ημέρας ($p=0,001$) και στους μέσους όρους των τίτλων της έβδομης ημέρας με αυτούς της δέκατης τέταρτης ημέρας ($p=0,000$).



Γράφημα 8: Μέσος όρος τίτλων του ιού RGNNV που ανιχνεύθηκαν με real time RT-PCR στις δύο πειραματικές ομάδες που διατράφηκαν με 1000 ppm και 2000 ppm αιθέριου ελαίου ρίγανης καθώς και στην ομάδα ελέγχου που διεδράφη με εμπορική τροφή.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Πείραμα 1^ο

Στελέχη Betanoda-ιών έχουν ανιχνευθεί σε πάνω από 30 είδη άγριων και εκτρεφόμενων ψαριών και διθύρων των ελληνικών θαλάσσιων. Η πρώτη αναφορά της νόσου στην Ελλάδα έγινε από τους Le Breton και συνεργάτες (1997), οι οποίοι περιέγραψαν την εμφάνιση επιζωotίας ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας, που χαρακτηριζόταν από την παρουσία μαζικών θνησιμοτήτων και έντονων νευρικών συμπτωμάτων, σε λαβράκια που εκτρέφονταν σε κλωβούς στη θάλασσα. Έκτοτε, απομονώσεις Betanoda-ιών από ψάρια, αλιευμένα στα ελληνικά χωρικά ύδατα, έχουν αναφερθεί σε λαβράκια, *Dicentrarchus labrax*, εκτρεφόμενα σε θαλασσινό (Sideris, 1997· Skliris *et al.*, 2001· Ucko *et al.*, 2004· Panzarin *et al.*, 2012) και γλυκό νερό (Athanasopoulou *et al.*, 2003), οξύρυγχους, *Acipenser sp.* (Athanasopoulou, Billinis and Prapas, 2004), τσιπούρες, *Sparus aurata* (Bitchava *et al.*, 2007· Panzarin *et al.*, 2012), μυλοκόπια (Katharios and Tsigenopoulos, 2010) και άγρια είδη του γένους *Epinephelus sp.* (Panzarin *et al.*, 2012). Μάλιστα, σε πρόσφατη επιδημιολογική μελέτη του ιού, που διενεργήθηκε από το εργαστήριο Ιχθυολογίας – Ιχθυοπαθολογίας του τμήματος Κτηνιατρικής Π.Θ. σε συνεργασία με το Διαγνωστικό Εργαστήριο του τμήματος Κτηνιατρικής Α.Π.Θ., διαπιστώθηκε παρουσία Betanoda-ιών σε συνολικά 34 είδη ψαριών και διθύρων, γεγονός που υποδηλώνει τη μεγάλη διασπορά του ιού στις Ελληνικές θάλασσες (Λάμπου, 2017· Chasalevris *et al.*, 2016). Η έρευνα αυτή κατέδειξε επίσης τη δυνατότητα οριζόντιας μετάδοσης του ιού μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων πληθυσμών πληθυσμών διαφορετικών ειδών, καθώς η γενετική παραλλακτικότητα των αλληλουχιών που αναλύθηκαν ήταν μικρή, ενώ ιοί προερχόμενοι από εκτρεφόμενους πληθυσμούς εντοπίστηκαν και σε άγριους πληθυσμούς (Λάμπου, 2017· Chasalevris *et al.*, 2016). Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή επιδιώχθηκε ο

εμπλουτισμός της ανωτέρω μελέτης με τη διερεύνηση της παρουσίας του ιού σε αλιεύματα προερχόμενα από το νότιο Αιγαίο. Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή, καθώς στα θαλάσσια ύδατα αυτής απαντάται πληθώρα ειδών, ορισμένα εκ των οποίων έχουν μεταναστεύσει από θαλάσσιες περιοχές που ανευρίσκεται συχνότερα ο γενότυπος SJNNV. Συνολικά αναλύθηκαν 25 ομαδοποιημένα δείγματα εγκεφάλου από 120 αλιεύματα που αντιστοιχούσαν σε 22 είδη ψαριών. Δύο εκ των ειδών που μελετήθηκαν (λαγοκέφαλος, *Lagocephalus Sceleratus* και γερμανός, *Siganus rivulatus*) ανήκουν σε ξενικά είδη που έχουν εισέλθει στα θαλάσσια ύδατα της περιοχής μέσω της διώρυγας του Σουέζ. Από το σύνολο των ομαδοποιημένων δειγμάτων που αναλύθηκε με real-time PCR, Betanoda-ιοί ανιχνεύθηκαν σε ένα δείγμα που αντιπροσώπευε 5 άτομα του είδους *Solea solea*, αλιευμένα από τη θαλάσσια περιοχή της Κρήτης. Από το εν λόγω γένος, έχουν απομονωθεί στελεχη Noda-ιών τόσο στα ελληνικά θαλάσσια ύδατα, αλλά και ευρύτερα στην περιοχή της Μεσογείου και της βόρειας Ευρώπης. Οι Starkley και συνεργάτες (2001), κατά τη διερεύνηση κρούσματος ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας σε εκτρεφόμενο μπακαλιάρο του Ατλαντικού στην Αγγλία, διαπίστωσαν ότι ο ιός μεταφέρθηκε στα ιχθύδια από γλώσσες που εκτρέφονταν στην μονάδα από την οποία προμηθεύτηκαν τα ψάρια. Οι Thiery και συνεργάτες (2004) ανέφεραν ανίχνευση ιού SJNNV σε εκτρεφόμενες γλώσσες, *Solea senegalensis*, από την περιοχή της Ισπανίας. Μάλιστα, ήταν η πρώτη φορά που ανιχνεύθηκε αυτός ο γενότυπος σε ψάρια που αλιεύθηκαν εκτός των ιαπωνικών υδάτων (Thiery *et al.*, 2004). Τρία χρόνια αργότερα, οι Cutrin και συνεργάτες (2007), ανίχνευσαν τον ίδιο γενότυπο σε γλώσσες από την Ιβηρική Χερσόνησο και διαπίστωσαν ότι εύκολα μπορεί να εξαπλωθεί σε εκτρεφόμενα είδη της περιοχής της Μεσογείου (Cutrin *et al.*, 2007). Από γλώσσες, *Solea senegalensis*, προερχόμενες από τα θαλάσσια ύδατα της Ισπανίας και της Πορτογαλίας απομονώθηκε και ανασυνδυασμένος Betanoda-ιός που έφερε RNA1 τμήμα του γενότυπου RGNNV και RNA2 τμήμα του γενότυπου SJNNV (Oliveira *et al.*, 2009). Ανάλογος ανασυνδυασμός ανιχνεύθηκε και σε κοινή γλώσσα *Solea solea* από τους

Panzarin και συνεργάτες (2012), οι οποίοι διαπίστωσαν ιδιαίτερη ευαισθησία του γένους στην προσβολή από ανασυνδυασμένους Betanoda-ιούς (Panzarin *et al.*, 2012). Betanoda-ιοί που ανήκαν στον γενότυπο RGNNV έχουν εντοπιστεί και σε κοινές γλώσσες στα ελληνικά θαλάσσια ύδατα σε δειγματοληψίες που έλαβαν χώρα τα έτη 2013 και 2016 (Λάμπου, 2017; Chasalevris *et al.*, 2016). Η ανίχνευση ενός Noda-ιού σε γλώσσες από την περιοχή του νοτίου Αιγαίου επιβεβαιώνει την ευαισθησία του είδους *Solea solea* στην προσβολή από ιούς του γένους *Betanodavirus*. Μάλιστα, δεδομένης της συχνότητας ανίχνευσης του ιού σε πληθυσμούς του είδους στα ελληνικά θαλάσσια ύδατα τα τελευταία χρόνια, η γλώσσα, μαζί με το λαβράκι και είδη του γένους *Epinephelus*, θα μπορούσε να αποτελεί είδος επιλογής για τη διερεύνηση της παρουσίας του ιού σε μια περιοχή. Η ανάλυση των αλληλουχιών τμήματος του γονιδίου της πολυμεράσης (pol) και της καψιδιακής πρωτεΐνης (cp) του ιού που απομονώθηκε, κατέδειξε ότι ανήκε στον γενότυπο RGNNV. Ο γενότυπος αυτός φαίνεται ότι απαντάται συχνότερα στα ελληνικά θαλάσσια ύδατα (Λάμπου, 2017; Chasalevris *et al.*, 2016). Ωστόσο, ανασυνδυασμένος ιός που έφερε RNA1 γενωμικό τμήμα του γενότυπου RGNNV και RNA2 γενωμικό τμήμα του SJNNV, εντοπίστηκε σε σαφρίδια από δειγματοληψία του έτους 2014 (Λάμπου, 2017), ενώ ανασυνδυασμοί εντός του γονιδίου της πολυμεράσης εντοπίστηκαν σε κουτσομούρες και λούτσους από δειγματοληψίες του έτους 2013, 2014 (Chasalevris *et al.*, 2016). Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την όλο και πιο συχνή εμφάνιση φαινομένων ανασυνδυασμού του ιού σε άτομα του γένους *Solea* από την περιοχή της Μεσογείου με σφοδρή συμπτωματολογία της νόσου (Oliveira *et al.*, 2009; Panzarin *et al.*, 2012), καθιστά επιτακτική την ανάγκη φυλογενετικής ανάλυσης και των δύο γενωμικών τμημάτων του ιού σε στελέχη που απομονώνονται από το εν λόγω γένος. Επιπλέον, με δεδομένο ότι η γλώσσα αποτελεί νέο εκτρεφόμενο είδος στην Ελλάδα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα είχε η *in vitro* μελέτη της παθογένειας και παθολογίας της νόσου στο είδος.

Στα υπόλοιπα ομαδοποιημένα δείγματα δεν ανευρέθη γονιδίωμα του ιού. Η συγκέντρωση μεγαλύτερου μεγέθους δείγματος και η επανάληψη της δειγματοληψίας στην περιοχή σε μελλοντικό χρόνο θα συνέδραμαν στο να διασαφηνιστεί αν το γεγονός αυτό σχετίζεται με περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως για παράδειγμα η θερμοκρασία των υδάτων κατά την περίοδο συλλογής των αλιευμάτων ή αποτελεί τυχαίο γεγονός.

Εν κατακλείδι, η έρευνα που διεξήχθη στα πλαίσια του πρώτου σκέλους του πειραματικού μέρους της μεταπτυχιακής διατριβής, αποτελεί συμβολή στη μελέτη της επιδημιολογίας του ιού Noda στην περιοχή του νοτίου Αιγαίου αλλά και ευρύτερα.

4.2 Πείραμα 2^ο

Η ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια έχει θεωρηθεί ως η πιο σοβαρή ιογενής απειλή στην εκτροφή ειδών του θαλασσινού νερού στην περιοχή της Μεσογείου. Το λαβράκι, *Dicentrarchus labrax*, συγκαταλέγεται στα πιο ευαίσθητα στον ιό είδη, με πληθώρα κρουμάτων της νόσου να αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία σε εκτρεφόμενους και άγριους πληθυσμούς.

Για τον έλεγχο της νόσου σε επίπεδο εκτροφής έχουν εφαρμοστεί διάφορα μέτρα με στόχο κυρίως την αποτροπή εισόδου του ιού, αλλά και την ανάσχεση της εξάπλωσης και του πολλαπλασιασμού του, σε περίπτωση εκδήλωσης συμπτωματολογίας στον ιχθυοπληθυσμό.

Η εφαρμογή προληπτικών μέτρων υγιεινής και καλύτερων πρακτικών διαχείρισης (Better Management Practises, BMPs), ο έλεγχος των γεννητόρων, των εκκολαπτόμενων προνυμφών ή του εισαγόμενου γόνου για παρουσία του ιού με μοριακές ή ορολογικές μεθόδους, η πλύση των αβγών με θαλασσινό νερό που περιέχει όζον, ο περιορισμός των ωτοκιών, η μείωση της ιχθυοπυκνότητας, οι εμβολιασμοί

των γεννητόρων είναι ενέργειες που αξιοποιούνται για την πρόληψη της νόσου στις υδατοκαλλιέργειες.

Ωστόσο, το γεγονός ότι η αποτελεσματικότητα των παραπάνω μέτρων ποικίλει, σε συνδυασμό με το ότι δεν έχει αναπτυχθεί έως σήμερα αποτελεσματική θεραπεία έναντι του ιού, καθιστά επιτακτική την ανάγκη για διερεύνηση νέων ουσιών – μεθόδων που θα μπορούσαν να έχουν προστατευτική δράση στη μόλυνση των ψαριών από τον ιο Noda.

Αναλογιζομένων των ανωτέρω, διερευνήθηκε η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, ως διαιτητικού συμπληρώματος, στην εκδήλωση και εξέλιξη της ιογενούς εγκεφαλοπάθειας και αμφιβληστροειδοπάθειας μετά από ενοφθαλμισμό λαβρακιών, *Dicentrarchus labrax* που διατράφηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτού, με τον ιό RGNNV. Το αιθέριο έλαιο ρίγανης συγκεντρώνει πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται αντιμικροβιακές, αντιμυκητιακές, αντιπαρασιτικές, αντιγλεγγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες.

Πρόσφατες έρευνες μάλιστα έχουν καταδείξει ευεργετική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης ως διαιτητικού συμπληρώματος και στα ψάρια έναντι πληθώρας παθογόνων παραγόντων. Οι Athanassopoulou και συνεργάτες (2004,b) ανέφεραν μείωση του ποσοστού συσσωρευτικής θνησιμότητας σε τσιπούρες μολυσμένες με *P. Sparis* μετά από εβδομήντα ημέρες χορήγησης αιθέριου ελαίου ρίγανης σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό των μαρτύρων στους οποίους δεν χορηγήθηκε η εν λόγω αγωγή. Παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν σε μυτάκι με παρασίτωση από *Myxobolus sp.* μετά από διατροφή του με συμπλήρωμα αιθέριου ελαίου ρίγανης (Athanassopoulou *et al.*, 2004a). Τα αποτελέσματα διδακτορικής διατριβής που εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ιχθυολογίας – Ιχθυοπαθολογίας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ, έδειξαν καθυστέρηση στην εμφάνιση και εξέλιξη της παστεριδίασης σε τσιπούρες που μολύνθηκαν με το βακτήριο *Photobacterium damsela subsp. Piscicida* κατόπιν διατροφής τους με συμπλήρωμα αιθέριου ελαίου ρίγανης για πενήντα ημέρες, σε σχέση με εκείνες στις οποίες δεν χορηγήθηκε συμπλήρωμα για το αντίστοιχο χρονικό

διάστημα (Γιαγνίση, 2011). Οι Zheng και συνεργάτες (2009) ανέφεραν ότι το αιθέριο έλαιο ρίγανης μπορεί να λειτουργήσει ως αυξητικός παράγοντας, να αυξήσει την αντιοξειδωτική δραστηριότητα, να ενισχύσει την περιεκτικότητα των μυών σε πρωτεΐνη και να προάγει την άμυνα του οργανισμού έναντι του παθογόνου *Aeromonas hydrophila*, όταν προστίθεται ως διαιτητικό συμπλήρωμα σε σιτηρέσια γατόψαρου. Σε μια άλλη μελέτη από τους Volpatti και συνεργάτες (2013), λαβράκια που διατράφηκαν με συμπλήρωμα καρβακρόλης για εννέα εβδομάδες, εμφάνισαν σημαντικά χαμηλότερη συσσωρευτική θνησιμότητα σε σχέση με τους μάρτυρες, όταν μολύνθηκαν με το βακτήριο *Listonella Anguillarum*. Αξιόλογη μείωση της συσσωρευτικής θνησιμότητας διαπιστώθηκε και σε ιριδίζουσες πέστρες που είχαν διατραφεί με σιτηρέσια που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθέριου ελαίου ρίγανης για 90 ημέρες, μετά από πειραματική μόλυνση τους με *Lactococcus garvieae* (Diler *et al.*, 2017). Στην ίδια μελέτη η διατροφή των ψαριών με συμπλήρωμα αιθέριου ελαίου ρίγανης οδήγησε και σε αύξηση της βιομάζας τους σε σχέση με αυτή των μαρτύρων (Diler *et al.*, 2017).

Στις παραπάνω έρευνες μελετήθηκε η επίδραση του αιθέριου ελαίου ρίγανης ως διαιτητικού συμπληρώματος στην άμυνα του οργανισμού διαφόρων ειδών ψαριών έναντι βακτηρίων και παρασίτων.

Η διερεύνηση της επίδρασης της χορήγησης διαιτητικού συμπληρώματος αιθέριου ελαίου ρίγανης στην εμφάνιση και εξέλιξη ενός ιογενούς νοσήματος διεξάγεται για πρώτη φορά σε ψάρια. Αντιική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης έχει διαπιστωθεί μόνο έναντι ιών που προσβάλλουν τον άνθρωπο και άλλα θηλαστικά (Rocio *et al.*, 2009· Pilau *et al.*, 2011· Elizaquivel *et al.*, 2013· Gilling *et al.*, 2014).

Οι συγκεντρώσεις 1% και 2% αιθέριου ελαίου ρίγανης επιλέχθηκαν μετά από ανασκόπηση της διεθνούς βιβλιογραφίας και με βάση τα αποτελέσματα πειραματισμών που διεξήχθησαν στο εργαστήριο Ιχθυολογίας – Ιχθυοπαθολογίας, σύμφωνα με τα οποία συγκεντρώσεις από 3% και πάνω οδηγούν σε μείωση της πρόσληψης τροφής από τα ψάρια (Γιαγνίση, 2011).

Τα αποτελέσματα των πειραματικών μολύνσεων κατέδειξαν ενδεχόμενη ευεργετική και προστατευτική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης, ως διαιτητικού συμπληρώματος, έναντι της μόλυνσης από *Betanoda*-ιούς. Η διαπίστωση αυτή στηρίζεται αφενός στην καθυστέρηση της εκδήλωσης και στην ηπιότερη εξέλιξη της κλινικής συμπτωματολογίας της νόσου στις ομάδες ιχθυδίων που διατράφηκαν με σιτηρέσιο που περιείχε αιθέριο έλαιο ρίγανης και αφετέρου στην καθυστέρηση της έναρξης της θνησιμότητας σε αυτές τις ομάδες. Ειδικά στην ομάδα που διατράφηκε με 2000 ppm αιθέριου ελαίου ρίγανης οι διαφορές σε αυτούς τους δείκτες συγκριτικά με τις άλλες πειραματικές ομάδες ήταν ιδιαίτερα εμφανείς.

Συγκεκριμένα, η εκδήλωση των κλινικών συμπτωμάτων άρχισε την τέταρτη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού στην ομάδα που διατράφηκε με 2000 ppm αιθέριου ελαίου ρίγανης, σε αντίθεση με την ομάδα που διατράφηκε με 1000 ppm αιθέριου ελαίου ρίγανης, όπου η εκκίνηση των συμπτωμάτων έλαβε χώρα την τρίτη ημέρα, και την ομάδα των θετικών μαρτύρων, στην οποία τα κλινικά συμπτώματα παρατηρήθηκαν μόλις από τη δεύτερη μέρα της μόλυνσης. Παράλληλα, εμφανής ήταν η βαρύτητα των συμπτωμάτων στην ομάδα έλεγχου (θετικός μάρτυρας) που διατράφηκε με εμπορική τροφή σε σχέση με την ομάδα που διατράφηκε με 2000ppm αιθέριου ελαίου ρίγανης. Μικρότερης κλίμακας διαφορές στην ένταση των συμπτωμάτων διαπιστώθηκαν μεταξύ της ομάδας θετικών μαρτύρων και της ομάδας που διατράφηκε με 1000 ppm. Αναφορικά με τη θνησιμότητα, παρατηρήθηκε σχετική καθυστέρηση στην εκδήλωση της θνησιμότητας στα ψάρια της ομάδας που διατράφηκαν με τροφή που περιείχε 2000 ppm αιθέριου ελαίου ρίγανης (ξεκίνησε την 6^η μέρα μετά τη μόλυνση), σε σχέση με την ομάδα λαβρακίων που διατράφηκαν με 1000ppm (3^η ημέρα) και την ομάδα των θετικών μαρτύρων (2^η ημέρα).

Η διερεύνηση της έκφρασης ανοσολογικών γονιδίων στα ψάρια των τριών πειραματικών ομάδων, που διενεργήθηκε από ερευνητική ομάδα του Ελληνικού Ιστιτούτου Παστέρ στα πλαίσια του προγράμματος "MIS375267", κατέδειξε ευεργετική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης στα λαβράκια που διατράφηκαν με την υψηλότερη

συγκέντρωση αυτού, φανερώνοντας ισχυρότερη ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος των ψαριών της ομάδας αυτής έναντι του ιού RGNNV. Η υπερέκφραση γονιδίων της κυτταρικής και χυμικής ανοσίας στην ομάδα που διατράφηκε με 2000 ppm, υποδηλώνει εκτός της ισχυρότερης ενεργοποίησης αντι-ιικών μηχανισμών και ανοσοτροποποιητική δράση του αιθέριου ελαίου ρίγανης.

Ωστόσο, παρόλο που διαπιστώθηκε καθυστέρηση στην έναρξη και ηπιότερη ένταση της κλινικής συμπτωματολογίας και της θνησιμότητας στις ομάδες που διατράφηκαν με αιθέριο έλαιο ρίγανης, η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων δεν κατέδειξε στατιστικώς σημαντική διαφορά τόσο μεταξύ των μέσων όρων των τίτλων του ιού RGNNV των τριών ομάδων, όσο και μεταξύ των μέσων όρων των ποσοστών θνησιμότητας που εμφάνισαν οι τρεις ομάδες.

Ο ενοφθαλμισμός των λαβρακιών με μέθοδο που προσομοιάζει τις φυσικές συνθήκες μόλυνσης, π.χ. με εμφύσηση, θα έδινε ενδεχομένως τη δυνατότητα επίδρασης της εμπλουτισμένης με αιθέριο έλαιο ρίγανης δίαιτας και σε αυτά τα μεγέθη και ως εκ τούτου θα οδηγούσε στην εξαγωγή πληρέστερων και ασφαλέστερων συμπερασμάτων αναφορικά με τον βαθμό προστασίας του αιθέριου ελαίου ρίγανης έναντι του ιού.

Ενδιαφέρον επίσης θα είχε η διατήρηση των λαβρακιών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα έτσι ώστε να παρατηρηθεί ενδεχόμενη διαφοροποίηση στην εξέλιξη των συμπτωμάτων, της θνησιμότητας και του ιικού φορτίου και να διαπιστωθεί αν υπάρχει διαφορά στην ταχύτητα της ανάρρωσης μεταξύ των τριών πειραματικών ομάδων.

Λαμβάνοντας υπόψη τις παρατηρήσεις αυτές, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης του αιθέριου ελαίου ρίγανης, ως διαιτητικού συμπληρώματος, στη μόλυνση λαβρακιών από *Betanoda*-ιούς, καθώς διαφαίνονται δυνατότητες ανάσχεσης της σφοδρότητας εκδήλωσης της νόσου και αναστολής του ιικού πολλαπλασιασμού.

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα ευρήματα αυτής της διατριβής, συνοψίζονται στα εξής:

- Η διερεύνηση της παρουσίας του ιού σε 25 ομαδοποιημένα δείγματα, που αντιστοιχούσαν σε 22 είδη και 9 οικογένειες ιχθύων, συνέβαλε στον εμπλουτισμό των γνώσεών μας αναφορικά με την επιδημιολογία του ιού Noda στην περιοχή του νοτίου Αιγαίου.
- Η ανίχνευση Betanoda-ιού σε δείγμα που απαρτιζόταν από άτομα του είδους *Solea solea*, επιβεβαιώνει ότι η κοινή γλώσσα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο είδος στη μόλυνση από ιούς Noda.
- Ο γενότυπος RGNNV απαντάται συχνότερα στα ελληνικά θαλάσσια ύδατα.
- Το αιθέριο έλαιο ρίγανης, όταν χορηγείται ως διαιτητικό συμπλήρωμα σε ιχθείς, ενδεχομένως ασκεί ευεργετική και προστατευτική δράση έναντι της μόλυνσης από ιούς Noda.
- Χρειάζονται περαιτέρω *in vitro* έρευνες με μεθόδους ενοφθαλμισμού του ιού που να προσομοιάζουν στη φυσική μόλυνση, προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο βαθμός προστασίας που παρέχει η διατροφή ιχθύων με αιθέριο έλαιο ρίγανης έναντι της μόλυνσης από ιούς Noda.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aranguren R., Tafalla C., Novoa B., Figueras A.** (2002) Nodavirus replication in a turbot cell line. *Journal of Fish Diseases*, 25: 361-366.
- Arimoto M., Sato J., Maruyama K., Mimura G., Furuuwa I.** (1996) Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, 143: 15–22.
- Arimoto M., Mori K., Nakai T., Muroga K., Furusawa I.** (1993) Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch and Schneider). *Journal of Fish Diseases*, 16: 461–469.
- Arimoto M., Mushiake K., Mizuta Y., Nakai T., Muroga K., Furusawa I.** (1992) Detection of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA). *Fish Pathology*, 27: 191-195.
- Aspehaug V., Devold M., Nylund A.** (1999) The phylogenetic relationship of nervous necrosis virus from halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 19 (5): 196-203.
- Athanassopoulou F., Billinis C., Prapas Th.** (2004) Important disease conditions of new cultured species (*Acipenser gueldenstaedi*, *Mugil sp.*, *Dicentrarchus labrax* and *Silurus sp.*, *Oreochromis sp.*) in intensive freshwater farming conditions in Greece: First incidence of Nodavirus infection in *Acipenser sp.* *Diseases of Aquatic Organisms*, 60: 247-252.
- Athanassopoulou F., Karagouni E., Dotsika E., Ragias V., Tavla J., Christofilloyanis P.** (2004a) Efficacy and toxicity of orally administrated anticoccidial drugs for innovative treatments of *Polysporoplasma spar* infection in *Sparus aurata* L., *Journal of Applied Ichthyology*, 20:345–354.
- Athanassopoulou F., Karagouni E., Dotsika E., Ragias V., Tavla J., Christofilloyanis P., Vatsos I.** (2004b) Efficacy and toxicity of orally administrated anticoccidial drugs for innovative treatments of *Myxobolus sp.* infection in *Puntazzo*

puntazzo, *Diseases of Aquatic Organisms*, 62: 217–226.

Athanassopoulou F., Billinis C., Psychas V., Karipoglou K. (2003) Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* L. farmed in freshwater recirculated and open system facilities in Greece. *Journal of Fish Diseases*, 26: 361-365.

Azad I.S., Jithendran K.P., Shekhar M.S., Thirunavukkarasu A.R., de la Pena L.D. (2006) Immunolocalisation of nervous necrosis virus indicates vertical transmission in hatchery produced Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch)-A case study. *Aquaculture*, 255 (1-4): 39-47.

Bader A., Cioni P-L., Flamini G. (2010) GC-MS analysis of the essential oils of ripe fruits, roots and flowering aerial parts of *Elaeoselinum asclepium* subsp. *meoides* growing in Sicily. *Natural product communications*, 5 (7): 1111- 1114.

Baeck G.W., Gomez D.K., Oh K.S., Kim J.H., Choresca C.H. Jr., Park S.C. (2007) Detection of piscine nodaviruses from apparently healthy wild marine fish in Korea. *Fish Pathology*, 27: 116–22.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446–475.

- Ball L.A., Johnson K.L.** (1999) Reverse genetics of nodavirus. *Advances in Virus Research*, 53: 229–244.
- Ball L.A., Amann J.M., Garrett B.K.** (1992) Replication of Nodamura virus after transfection of viral RNA into mammalian cells in culture. *Journal of Virology*, 66 (4): 2326–2334.
- Bampidis V., Christodoulou V., Florou-Paneri P., Christaki E.** (2006) Effect of dried oregano leaves versus neomycin in treating newborn calves with colibacillosis. *Journal of veterinary medicine*, 53 (3): 154-6.
- Banu G.R., Mori K., Arimoto M., Chowdhury M.B.R., Nakai T.** (2004) Portal Entry and Progression of Betanodavirus causing Viral Nervous Necrosis in Sevenband Grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 2: 83-87.
- Baud M., Cabon J., Salomoni A., Toffan A., Panzarin V., Bigarré L.** (2015) First generic one step real-time Taqman RT-PCR targeting the RNA1 of betanodaviruses. *Journal of Virological Methods*, 211: 1-7.
- Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A., Beauchemin K.A.** (2008) A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145 (1-4): 209-228.
- Bigarré L., Cabon J., Baud M., Heimann M., Body A., Loeffrig F., Castric J.** (2009) Outbreak of betanodavirus infection in tilapia (*Oreochromis niloticus* L.), in fresh water. *Journal of Fish Diseases*, 32: 667–673.
- Binesh C.P., Greeshma C., Jithendran K.P.** (2013) Genomic classification of betanodavirus by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Archives of Virology*, 158: 1589–1594.
- Binesh C.P.** (2013) Mortality due to viral nervous necrosis in zebrafish (*Danio rerio*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Diseases of Aquatic Organisms*, 104: 257–260.
- Bitchava K., Xylouri E., Fragkiadaki E., Athanassopoulou F., Papanastassopoulou M., Sabatakou O.** (2007) First incidence of clinical signs of

nodavirus infection in sea bream, *Sparus auratus* L., showing nervous clinical signs.

The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh, 59 (1): 3-9.

Bloch B., Gravningen K., Larsen J.L. (1991) Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Diseases of Aquatic Organisms*, 10: 65-70.

Boonyaratpalin S., Supamattaya K., Kasornchandra J., Hoffmann R.W. (1996) Picorna-like virus associated with mortality and spongy encephalopathy in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 26: 75-80.

Bovo G., Gustinelli A., Quaglio F., Gobbo F., Panzarin V., Fusaro A., Fioravanti M.L. (2011) Viral encephalopathy and retinopathy outbreak in freshwater fish farmed in Italy. *Diseases of Aquatic Organisms*, 96: 45.

Bovo G., Nishizawa T., Maltese C., Borghesan F., Mutinelli F., Montesi F., De Mas S. (1999) Viral encephalopathy and retinopathy of farmed marine fish species in Italy. *Virus research*, 63: 143-146.

Breuil G., Pepin J.F.P., Boscher S., Thiery R. (2002) Experimental vertical transmission of nodavirus from broodfish to eggs and larvae of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 25: 697-702.

Breuil G., Mouchel O., Fauvel C., Pepin J.F. (2001) Sea bass *Dicentrarchus labrax* nervous necrosis virus isolates with distinct pathogenicity to sea bass larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45: 25-31.

Breuil G., Pepin J.F., Castric J., Fauvel C., Thiery R. (2000) Detection of serum antibodies against nodavirus in wild and farmed adult sea bass: application to the screening of broodstock in sea bass hatcheries. *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 20 (3): 95-100.

Breuil G., Romestand B. (1999) A rapid ELISA method for detecting specific antibody level against nodavirus in the serum of the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): application to the screening of spawners in a sea bass hatchery. *Journal of Fish Diseases*, 22: 45-52.

Breuil G., Bonami J.R., Pepin J.F., Pichot Y. (1991) Viral infection (picornalike virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*, 97: 109-116.

Buchan K.A.H., Martin-Robichaud D.J., Benfrey T.J., MacKinnon A.-M., Boston L. (2006) The efficacy of ozonated seawater for surface disinfection of Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) eggs against piscine nodavirus. *Aquacultural Engineering*, 35 (1): 102-107

Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C. (2006): Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 89 (2): 761-771.

Callinan R.B. (1988) Diseases of Australian native fishes. In: *Fish Diseases*, edited by D.I. Bryden, Post Graduate Committee in Veterinary Science, University of Sydney, Sydney, 459-472.

Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P.W., Castillejos L., Ferret A. (2007) Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 90 (6): 2580-95.

Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., Mc Geoch D.J., Pringle C.R., Wickner R.B. (2000) Virus Taxonomy. Academic Press, San Diego.

Castric J., Thiery R., Jeffroy J., de Kinkelin P., Raymond J.C. (2001) Sea bream *Sparus aurata*, an asymptomatic contagious fish host for nodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 47: 33-38.

Chang M., Collet B., Nie P., Lester K., Campbell S., Secombes C.J., Zou J. (2011a) Expression and functional characterization of the RIG-I-like receptors MDA5 and LGP2 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Virology*, 85: 8403–8412.

Chang Y.T., Kai Y.H., Chi S.C., Song Y.L. (2011b) Cytotoxic CD8a+ leucocytes have heterogeneous features in antigen recognition and class I MHC restriction in grouper. *Fish and Shellfish Immunology*, 30: 1283–1293.

- Chang S.F., Ngoh G.H., Kueh L.F.S., Qin Q.W., Chen C.L., Lam T.J., Sin Y.M.** (2001) Development of a tropical marine fish cell line from Asian seabass (*Lates calcarifer*) for virus isolation. *Aquaculture*, 192: 133-145.
- Charles D.J., Joly R.-J., Simon J.E.** (1990) Effect of osmotic stress on the essential oil content and comparison of peppermint. *Phytochemistry*, 2: 2837–2840.
- Chasalevris T., Lampou E., Bitchava K., Dovas C.I., Athanassopoulou F.** (2016) Detection of Betanodavirus no fish and bivalves on Greek Seawaters. European Aquaculture Society meeting, 20-23 September 2016, Edinburgh, Scotland.
- Chaves-Pozo E., Guardiola F.A., Mesequer J., Esteban M.A., Cuesta A.** (2012) Nodavirus infection induces a great innate cell-mediated cytotoxic activity inresistant, gilthead sea bream, and susceptible, European sea bass, teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 33: 1159–1166.
- Chen S.P., Peng R.H., Chiou P.P.** (2015) Modulatory effect of CpG oligodeoxynucleotide on a DNA vaccine against nervous necrosis virus in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish and Shellfish Immunology*, 45: 919-926.
- Chen Y.M., Wang T.Y., Chen T.Y.** (2014) Immunity to betanodavirus infections of marine fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 43: 174-183.
- Chen Y.M., Shih C.H., Liu H.C., Wu C.L., Wang H.C., Chen T.Y., Yang H.L., Lin J.H.Y.** (2011a) An oral nervous necrosis virus vaccine using *Vibrio anguillarum* as an expression host provides early protection. *Aquaculture*, 321: 26–33.
- Chen Y.M., Kuo C.E., Lin C.M., Shie P.S., Chen T.Y.** (2011b) Cloning of crystalline from orange-spotted grouper and characterization of its activity as potential protective agent. *Results in Immunology*, 1: 60-69.
- Chen Y.M., Su Y.L., Shie P.S., Huang S.L., Yang H.L., Chen T.Y.** (2008) Grouper Mx confers resistance to nodavirus and interacts with coat protein. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 825-836.
- Chen C.W., Wu M.S., Huang Y.J., Cheng C.A., Chang C.Y.** (2015) Recognition of linear B-cell epitope of Betanodavirus coat protein by RG-M18 neutralizing mAb

inhibits Giant Grouper Nervous Necrosis Virus (GGNNV) Infection. *PloS One*, 10: 0126121.

Chen L.J., Su Y.C., Hong J.R. (2009) Betanodavirus non-structural protein B1: A novel anti- necrotic death factor that modulates cell death in early replication cycle in fish cells. *Virology*, 385: 444-454.

Chérif N., Thiéry R., Castric J., Biacchesi S., Brémont M., Thabti F., Limem L., Hammami S. (2009) Viral encephalopathy and retinopathy of *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in Tunisia. *Veterinary Research Communications*, 33: 345–353.

Chi S.C., Wu Y.C., Cheng T.M. (2005) Persistent infection of betanodavirus in a novel cell line derived from the brain tissue of barrumundi *Lates calcarifer*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 65: 91–98.

Chi S.C., Shieh J.R., Lin S.J. (2003) Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55: 221–228.

Chi S.C., Hu W.W., Lo B.J. (1999) Establishment and characterization of a continuous cell line (GF-1) derived from grouper, *Epinephelus coioides* (Hamilton): a cell line susceptible to grouper nervous necrosis virus (GNNV). *Journal of Fish Diseases*, 22: 173–182.

Chi S.C., Lo C.F., Kou G.H., Chang P.S., Peng S.E., Chen S.N. (1997) Mass mortalities associated with viral nervous necrosis (VNN) disease in two species of hatchery-reared grouper, *Epinephelus fuscogutatus* and *Epinephelus akaara* (Temminck and Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 20: 185–93.

Chua F.H.C., Loo J.J., Wee J.Y. (1995) Mass mortality in juvenile greasy grouper, *Epinephelus tauvina*, associated with vacuolating encephalopathy and retinopathy. *Diseases in Asian Aquaculture*, 11: 235–41.

Coeurdacier J.-L., Laporte F., J.-F. Pepin (2003) Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. *Fish and Shellfish Immunology*, 14 (5): 435-447.

- Comps M., Pepin J.F., Bonami J.R.** (1994) Purification and characterization of two fish encephalitis viruses (FEV) infecting *Lates calcarifer* and *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 123: 1-10.
- Costa J.Z., Thompson K.D.** (2016) Understanding the interaction between Betanodavirus and its host for the development of prophylactic measures for viral encephalopathy and retinopathy. *Fish and Shellfish Immunology*, 53: 35–49.
- Costa J.Z., Adams A., Bron J.E., Thompson K.D., Starkey W.G., Richards R.H.** (2007) Identification of B-cell epitopes on the betanodavirus capsid protein. *Journal of Fish Diseases*, 30: 419-429.
- Cross D.E., McDevitt R.M., Hillman K., Acamovic T.** (2007) The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British poultry science*, 48 (4): 496-506.
- Cunningham C.O.** (2002) Molecular diagnosis of fish and shellfish diseases: present status and potential use in disease control. *Aquaculture*, 206: 19-55.
- Cutrin J.M., Dopazo C.P., Thiery R., Leao P., Oliveira J.G., Barja J.L., Bandin I.** (2007) Emergence of pathogenic betanodaviruses belonging to the SJNNV genogroup in farmed fish species from the Iberian Peninsula. *Journal of Fish Diseases*, 30: 225-232.
- Dalla Valle L., Toffolo V., Lamprecht M., Maltese C., Bovo G., Belvedere P., Colombo L.** (2005) Development of a sensitive and quantitative diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on two-target real-time PCR. *Veterinary Microbiology*, 110: 167–179.
- Dalla Valle L., Negrisolo E., Patarnello P., Zanella L., Maltese C., Bovo G., Agripolis P.T.** (2001) Sequence comparison and phylogenetic analysis of fish nodaviruses based on the coat protein gene. *Archives of Virology*, 146: 1125–1137.
- Dalla Valle L., Zanella L., Patarnello P., Paolucci L., Belvedere P., Colombo L.** (2000) Development of a sensitive diagnostic assay for fish nervous necrosis virus based on RT-PCR plus nested PCR. *Journal of fish diseases*, 23: 321-327.

- Danayadol Y., Direkbusarakom S., Supamattaya K.** (1995) Viral nervous necrosis in brownspotted grouper, *Epinephelus malabaricus*, cultured in Thailand. In: *Diseases in Asian Aquaculture II*, edited by M. Shariff, J.R. Arthur and R.P. Subasinghe, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, 227–233.
- Dannevig B.H., Nilsen R., Modahl I., Jankowska M., Taksdal T., Press C.M.** (2000) Isolation in cell culture of nodavirus from farmed Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43: 183–189.
- Denzin N., Staak C.** (2000) Fish immunoglobulin—a serodiagnostics perspective. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 20: 60–64.
- Diler O., Gormez O., Diler I., Metin S.** (2017) Effect of oregano (*Origanum onites* L.) essential oil on growth, lysozyme and antioxidant activity and resistance against *Lactococcus garvieae* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 23(4): 844–851.
- Dios S., Poisa-Beiro L., Figueras A., Novoa B.** (2007) Suppression subtraction hybridization (SSH) and macroarray techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus. *Molecular Immunology*, 44: 2195–2204.
- Elizaquível P., Azizkhani M., Aznar R., Sánchez G.** (2013) The effect of essential oils on norovirus surrogates. *Food Control*, 32: 275–278.
- Fenner B.J., Thiagarajan R., Chua H.K., Kwang J.J.** (2006) Betanodavirus B2 is an RNA interference antagonist that facilitates intracellular viral RNA accumulation. *Journal of Virology*, 80 (1): 85–94.
- Frerichs G.N., Tweedie A., Starkey W.G., Richards R.H.** (2000) Temperature, pH, and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. *Aquaculture*, 185: 13–24.
- Frerichs G.N., Rodger H.D., Peric Z.** (1996) Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Journal of General Virology*, 77: 2067–2071.

- Friesen P.D., Rueckert R.R.** (1984) Early and late functions in a bipartite RNA virus: evidence for translational control by competition between viral mRNA. *Journal of Virology*, 49: 116-124.
- Fukuda Y., Nguyen H.D., Furuhashi M., Nakai T.** (1996) Mass mortality of cultured sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathology*, 31: 165-170.
- Gagné N., Johnson S. C., Cook-Versloot M., MacKinnon A. M., Olivier G.** (2004) Molecular detection and characterization of nodavirus in several marine fish species from the north eastern Atlantic. *Diseases of Aquatic Organisms*, 62: 181–189.
- Gilling D.H., Kitajima M., Torrey J.R., Bright K.R.** (2014). Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. *Journal of Applied Microbiology*, 116: 1149-1163.
- Gjessing M.C., Kvellestad A., Ottesen K., Falk K.** (2009) Nodavirus provokes subclinical encephalitis and retinochoroiditis in adult farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases*, 32: 421–431.
- Glazebrook J.S., Heasman M.P., De Beer S.W.** (1990) Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases*, 13: 245-249.
- Glazebrook J.S., Campbell R.S.F.** (1987) Diseases of barramundi (*Lates calcarifer*) in Australia: a review. In: Management of Wild and Cultured Sea Bass/Barramundi *Lates calcarifer*, edited by Copland J.W., Grey D.I., ACIAR, Canberra, 204-206.
- Gomez D.K., Matsuoka S., Mori K., Okinaka Y., Park S.C., Nakai T.** (2009) Genetic analysis and pathogenicity of betanodavirus isolated from wild red spotted grouper *Epinephelus akaara* with clinical signs. *Archives of Virology*, 154: 343–346.
- Gomez D.K., Baeck G.W., Kim J.H., Choresca C.H., Park S.C.** (2008) Molecular detection of betanodavirus in wild marine fish populations in Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20: 38–44.

- Gomez D.K., Lim D.J., Baeck G.W., Youn H.J., Shin N.S., Youn H.Y., Park S.C.** (2006) Detection of betanodaviruses in apparently healthy aquarium fishes and invertebrates. *Journal of Veterinary Science*, 7: 369–374.
- Gomez D.K., Sato J., Mushiake K., Isshiki T., Okinaka Y., Nakai T.** (2004) PCR-based detection of betanodaviruses from cultured and wild marine fish with no clinical signs. *Journal of Fish Diseases*, 27: 603–608.
- Grotmol S., Totland G.K.** (2000) Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 39: 89–96.
- Grotmol S., Bergh O., Totland G.K.** (1999) Transmission of viral encephalopathy and retinopathy (VER) to yolk-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: occurrence of nodavirus in various organs and a possible route of infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36: 95-106.
- Grotmol S., Totland G.K., Thorud K., Hjeltne B.K.** (1997a) Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut-*Hippoglossus hippoglossus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29: 85–97.
- Grotmol S., Totland G.K., Kryvi H.** (1997b) Detection of nodavirus-like agent in heart tissue from reared Atlantic salmon *Salmo salar* suffering from cardiac myopathy syndrome (CMS). *Diseases of Aquatic Organisms*, 29: 79-84.
- Grotmol S., Totland G.K., Kvellestad A., Fjell K., Olsen A.B.** (1995) Mass mortality of larval and juvenile hatchery-reared halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) associated with the presence of virus-like particles in the central nervous system and retina. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 15: 176-180.
- Grove S., Faller R., Soleim B.K., Dannevig B.H.** (2006) Absolute quantitation of RNA by a competitive real-time RT-PCR method using piscine nodavirus as a model. *Journal of Virological Methods*, 132 (1-2): 104-112.

- Grove S., Johansen R., Dannevig B.H., Reitan L.J., Ranheim T.** (2003) Experimental infection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* with nodavirus: tissue distribution and immune response. *Diseases of Aquatic Organisms*, 53: 211-221.
- Hata N., Okinaka Y., Sakamoto T., Iwamoto T., Nakai T.** (2007) Upper temperature limits for the multiplication of betanodaviruses. *Fish Pathology*, 42: 225-228.
- He M., Teng C.-B.** (2015) Divergence and codon usage bias of Betanodavirus, a neurotropic pathogen in fish. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 83: 137-142.
- Hegde A., Teh H.C., Lam T.J., Sin Y.M.** (2003) Nodavirus infection in freshwater ornamental fish, guppy *Poicelia reticulata*—comparative characterization and pathogenicity studies. *Archives of Virology*, 148: 575–86.
- Hick P., Schipp G., Bosmans J., Humphrey J., Whittington R.** (2011) Recurrent outbreaks of viral nervous necrosis in intensively cultured barramundi (*Lates calcarifer*) due to horizontal transmission of betanodavirus and recommendations for disease control. *Aquaculture*, 319: 41–52.
- Hick P., Whittington R.J.** (2010) Optimisation and validation of a real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of betanodavirus. *Journal of Virological Methods*, 163: 368–377.
- Huang Y., Huang X., Cai J., OuYang Z., Wei S., Wei J., Qin Q.** (2015a) Identification of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) interferon regulatory factor 3 involved in antiviral immune response against fish RNA virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 42: 345-352.
- Huang Y.C., Lin T.S., Peng C., Chan N.L., Han Y.S.** (2015b) Strong inhibition of betanodavirus replication by ribavirin targeting RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Fish diseases*, 39 (5): 619–623.
- Huang B., Tan C., Chang S.F., Munday B., Mathew J.A., Ngoh G.H., Kwang J.** (2001) Detection of nodavirus in barramundi, *Lates calcarifer* (Block), using recombinant coat protein-based ELISA and RT-PCR. *Journal of Fish Diseases*, 24: 135–141.

Husgaro S., Grotmol S., Hjeltne B., Rodseth O.M., Biering E. (2001) Immune response to a recombinant capsid protein of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in turbot *Scophthalmus maximus* and Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*, and evaluation of a vaccine against SJNNV. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45: 33-44.

Ichinose T. (2013) Evaluation of antiviral activity of Oligonol, an extract of *Litchi chinensis*, against betanodavirus. *Drug Discoveries and Therapeutics*, 7 (6): 254-60.

ICTV, International Committee of Taxonomy of Viruses.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_nodav.htm

Iwamoto T., Mise K., Takeda A., Okinaka Y., Mori K., Arimoto M., Okuno T., Nakai T. (2005) Characterization of striped jack nervous necrosis virus subgenomic RNA3 and biological activities of its encoded protein B2. *Journal of General Virology*, 86: 2807-2816.

Iwamoto T., Nakai T., Mori K., Arimoto M., Furusawa I. (2000) Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of Aquatic Organism*, 43: 81-89.

Iwamoto T., Mori K., Arimoto M., Nakai T. (1999) High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Diseases of Aquatic Organisms*, 39: 37-47.

Jaramillo D., Hick P., Deece K., Tweedie A., Kirkland P., Arzey E., Whittington R.J. (2016) Comparison of ELISA formats for detection of antibodies specific for nervous necrosis virus (Betanodavirus) in the serum of immunized barramundi *Lates calcarifer* and Australian bass *Macquaria novemaculeata*. *Aquaculture*, 451: 33-38.

Jithendran K.P., Shekhar M.S., Kannappan S., Azad I.S. (2011) Nodavirus infection in freshwater ornamental fishes in India: diagnostic histopathology and nested RT-PCR. *Asian Fisheries Society*, 24: 12-9.

Johansen R., Sommerset I., Torud B., Korsnes K., Hjortaas M.J., Nilsen F., Nerland A.H., Dannevig B.H. (2004) Characterization of nodavirus and viral encephalopathy and retinopathy in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 27: 591-601.

Johansen R., Amundsen M., Dannevig B.H., Sommer A.I. (2003) Acute and persistent experimental nodavirus infection in spotted wolffish *Anarhichas minor*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57: 35-41.

Johnson S., Sperker S., Leggiadro C., Groman D., Griffiths S., Ritchie R., Cook M., Cusack R. (2002) Identification and characterization of a Piscine Neuropathy and Nodavirus from Juvenile Atlantic Cod from the Atlantic Coast of North America. *Journal of Aquatic Animal Health*, 14: 124-133.

Kai Y.H., Wu Y.C., Chi S.C. (2014) Immune gene expressions in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) induced by bath and oral vaccinations with inactivated betanodavirus. *Fish and Shellfish Immunology*, 40: 563-569.

Kai Y.H., Su H.M., Tai K.T., Chi S.C. (2010) Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus. *Vaccine*, 28: 996–1001.

Kai Y.H., Chi S.C. (2008) Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine*, 26: 1450-1457.

Kamatou G.P.P., van Zyl R.L., van Vuuren S.F., Viljoen A.M., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Tilney P.M. (2006) Chemical composition, leaf trichome types and biological activities of the essential oils of four related *Salvia* species indigenous to Southern Africa. *Journal of Essential Oil Research*, 18: 72-79.

Katharios P., Tsigenopoulos C. (2010) First report of nodavirus outbreak in cultured juvenile shi drum, *Umbrina cirrosa* L., in Greece. *Aquaculture Research*, 42: 147-152.

Korsnes K., Karlsbakk E., Devold M., Nerland A.H., Nylund A. (2009) Tissue tropism of nervous necrosis virus (NNV) in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., after intraperitoneal challenge with a virus isolate from diseased Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 32: 655–665.

Korsnes K., Devold M., Nerland A.H., Nylund A. (2005) Viral encephalopathy and retinopathy (VER) in Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal challenge with a

nodavirus from Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68: 7–15.

Kuan Y.C., Sheu F., Lee G.C., Tsai M.W., Hung C.L., Nan F.H. (2012) Administration of recombinant Reishi immunomodulatory protein (rLZ-8) diet enhances innate immune responses and elicits protection against nervous necrosis virus in grouper *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 32: 986-993.

Kuo H.P., Chung, C.L., Hung Y.F., Lai Y.S., Chiou P.P., Lu M.W. (2016) Comparison of the responses of different recombinant fish type I interferons against betanodavirus infection in grouper. *Fish and Shellfish Immunology*, 49: 143-153.

Kuo H.C., Wang T.Y., Hsu H.H., Chen P.P., Lee S.H., Chen M.C., Tsai T.J., Wang C.K., Ku H.T., Lee G.B., Chen T.Y. (2012a) Nervous necrosis virus replicates following the embryo development and dual infection with iridovirus at juvenile stage in grouper. *PLoS One*, 7: e36183.

Kuo H.C., Wang T.Y., Hsu H.H., Lee S.H., Chen Y.M., Tsai T.J., Ou M.-C., Ku H.-T., Lee G.-B., Chen t.-U. (2012b) An automated microfluidic chip system for detection of piscine nodavirus and characterization of its potential carrier in grouper farms. *PLoS One*, 7: e42203.

Lai Y.X., Jin B.L., Xu Y., Huang L.J., Huang R.Q., Zhang Y., Kwang J., He J.G., Xie J.F. (2014) Immune responses of orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, against virus-like particles of betanodavirus produced in *Escherichia coli*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 157: 87-96.

Lai Y.S., Chiu H.C., Murali S., Guo I.C., Chen S.C., Fang K., Chang C.Y. (2001) Propagation of yellow grouper nervous necrosis virus (YGNNV) in a new nodavirus susceptible cell line from yellow grouper, *Epinephelus awoara* (Temminck and Schlegel), brain tissue. *Journal of Fish Diseases*, 24: 299–309.

LaPatra S.E. (1996) The use of serological techniques for virus surveillance and certification of fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 6: 15–28.

- Le Breton A., Grisez L., Sweetman J., Olievier F.** (1997) Viral nervous necrosis (VNN) associated with mass mortalities in cage-reared sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of fish diseases*, 20: 145-151.
- Lin C.C., Lin J.H.Y., Chen M.S., Yang H.L.** (2007) An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture*, 268: 265-273.
- Lin C.H., Christopher John J.A., Lin C.H., Chang C.Y.** (2006) Inhibition of nervous necrosis virus propagation by fish Mx proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351: 534-539.
- Liu W., Hsu C.H., Chang C.Y., Chen H.H., Lin C.S.** (2006) Immune response against grouper nervous necrosis virus by vaccination of virus-like particles. *Vaccine*, 24: 6282-6287.
- Liu W., Hsu C.H., Hong Y.R., Wu S.C., Wang C.H., Wu Y.M., Chao C.B., Lin C.S.** (2005) Early endocytosis pathways in SSN-1 cells infected by dragon grouper nervous necrosis virus. *Journal of General Virology*, 86: 2553–2561.
- Lopez-Jimena B., Garcia-Rosado E., Thompson K.D., Adams A., Infante C., Borrego J.J., Alonso, M.C.** (2012). Distribution of redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) antigens in nervous and non-nervous organs of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) during the course of an experimental challenge. *Journal of Veterinary Science*, 13: 355–362.
- Lopez-Jimena B., Alonso M., Thompson K.D., Adams A., Infante K., Castro D., Borrego J., Rosado E.G** (2011) Tissue distribution of Red Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) genome in experimentally infected juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Veterinary Microbiology*, 154: 86-95.
- Lopez-Jimena B., Cherif N., Garcia-Rosado E., Infante C., Cano I., Castro D., Alonso M.C.** (2010) A combined RT-PCR and dot-blot hybridization method reveals the coexistence of SJNNV and RGNNV betanodavirus genotypes in wild meagre (*Argyrosomus regius*). *Journal of Applied Microbiology*, 109: 1361–1369.

- Lu M.W., Chao Y.M., Guo T.C., Santi N., Evensen O., Kasani S.K., Hong J.R., Wu J.L.** (2008) The interferon response is involved in nervous necrosis virus acute and persistent infection in zebrafish infection model. *Molecular Immunology*, 45: 1146–1152.
- Maenner K., Vahjen W., Simon O.** (2011) Studies on the effects of essential-oil-based feed additives on performance, ileal nutrient digestibility, and selected bacterial groups in the gastrointestinal tract of piglets. *Journal of animal science*, 89 (7): 2106-12.
- Maltese C., Bovo G.** (2007) Viral encephalopathy and retinopathy. *Ittiopatologia*, 4: 93–146.
- Manin B.O., Ransangan J.** (2011) Experimental evidence of horizontal transmission of betanodavirus in hatchery-produced Asian seabass, *Lates calcarifer* and brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* fingerling. *Aquaculture*, 321: 157–65.
- Mazelet L., Dietrich J., Rolland J.L.** (2011) New RT-qPCR assay for Viral Nervous Necrosis Virus detection in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.): application and limits for hatcheries sanitary control. *Fish and Shellfish Immunology*, 30: 27–32.
- Mekata T., Satoh J., Inada M., Dinesh S., Harsha P., Itami T., Sudhakaran R.** (2014) Development of simple, rapid and sensitive detection assay for grouper nervous necrosis virus using real-time loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Fish Diseases*, 38: 873-879.
- Mézeth K.B., Patel S., Henriksen H., Szilvay A.M., Nerland A.H.** (2009) B2 protein from betanodavirus is expressed in recently infected but not in chronically infected fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 83 (2): 97-103.
- Mladineo I.** (2003) The immunohistochemical study of nodavirus changes in larval, juvenile and adult sea bass tissue. *Journal of Applied Ichthyology*, 19 (6): 366.
- Montes A., Figueras A., Novoa B.** (2010) Nodavirus encephalopathy in turbot (*Scophthalmus maximus*): inflammation, nitric oxide production and effect of anti-inflammatory compounds. *Fish and Shellfish Immunology*, 28: 281–288.

- Moody N.J.G., Horwood P.F., Reynolds A., Mahony T.J., Anderson I.G., Oakey H.J.** (2009) Phylogenetic analysis of betanodavirus isolates from Australian finfish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 87: 151–160.
- Mori K., Sugaya T., Nishioka T., Gomez D.K., Fujinamy Y., Oka M., Arimoto M., Okinaka Y., Nakai T.** (2005) Detection of Betanodaviruses from feed fish used in marine aquaculture. In: *12th International Conference Diseases of Fish and Shellfish*, European Association of Fish Pathologists. Copenhagen (Denmark), 11–16 September 2005. Abstract O-142.
- Mori K., Mangyoku T., Iwamoto T., Arimoto M., Tanaka S., Nakai T.** (2003) Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 57: 19-26.
- Mori K., Mushiake K., Arimoto M.** (1998) Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathology*, 33: 443-444.
- Mori K., Nakai T., Muroga K., Arimoto M., Mushiake K., Furusawa I.** (1992) Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, 187: 368-371.
- Mori K., Nakai T., Nagahara M., Muroga K., Mekuchi T., Kanno T.** (1991) A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathology*, 26: 209-210.
- Munday B.L., Kwang J., Moody N.** (2002) Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 25: 127-142.
- Munday B.L., Nakai T.** (1997) Special topic review: nodaviruses as pathogens in larval and juvenile marine finfish. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13: 375–381.
- Munday B.L., Langdon J.S., Hyatt A. and Humphrey J.D.** (1992) Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Aquaculture*, 103: 197-211.

Mushiake K., Nishizawa T., Nakai T., Furusawa I., Muroga K. (1994) Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathology*, 29: 177-182.

Mushiake K., Nakai T., Muroga K., Sekiya S., Furusawa I. (1993) Viral nervous necrosis (VNN) of striped jack: effects of plasma antibody level of spawners and spawning conditions on the occurrence of the disease in their offsprings. *Suisanzosyoku*, 41: 327-332 (in Japanese with English summary).

Mushiake K., Arimoto M., Furusawa T., Furusawa I., Muroga K. (1992) Detection of antibodies against striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) from brood stocks of striped jack. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 2351-2356.

Nagai T., Nishizawa T. (1999) Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA 1 of striped jack nervous necrosis virus. *Journal of General Virology*, 80: 3019-3022.

Nagegowda D. (2010) Plant volatile terpenoid metabolism: biosynthetic genes, transcriptional regulation and subcellular compartmentation. *FEBS letters. Federation of European Biochemical Societies*, 584 (14): 2965-73.

Nakai T., Mori K., Sugaya T., Nishioka T., Mushiake K., Yamashita H. (2009) Current knowledge on viral nervous necrosis (VNN) and its causative betanodaviruses. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 61: 198–207.

Nakai T., Mori K., Arimoto M., Muroga K. (1995) Neutralizing antibody production in Striped Jack immunized with a recombinant coat protein of Striped Jack Nervous Necrosis Virus (SJNNV) in: *7th International Conference 'Diseases of Fish and Shellfish'*, European Association of Fish Pathologists. Palma de Mallorca (Spain), 10-15 September. Abstract: 179.

Nerland A.H., Skaar C., Eriksen T.B., Bleie H. (2007) Detection of nodavirus in seawater from rearing facilities for Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 73: 201–205.

- Nguyen H.D., Mushiake K., Nakai T., Muroga K.** (1997) Tissue distribution of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in adult striped jack. *Diseases of Aquatic Organisms*, 28: 87-91.
- Nguyen H.D., Nakai T., Muroga K.** (1996) Progression of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) infection in naturally and experimentally infected striped jack *Pseudocaranx dentex* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 24 (2): 99-105.
- Nguyen H.D., Mekuchi T., Imura K., Nakai T., Nishizawa T., Muroga, K.** (1994) Occurrence of viral nervous necrosis (VNN) in hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 60: 551-554.
- Nilsen R., Ranheim T., Hansen M.K., Taksdal T., Totland G.K.** (2001) Pathology in persistent nodavirus infected juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. In: *Tenth International Conference of the European Association of Fish Pathologists*, Dublin, 9-14 September, Abstract: 117.
- Nishizawa T., Takami I., Yoshimizu M., Oh M.J.** (2011) Required dose of fish nervous necrosis virus (NNV) for Poly (I: C) immunization of sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Aquaculture*, 311: 100-104.
- Nishizawa T., Takano R., Muroga K.** (1999) Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped jack nervous necrosis virus. *Journal of General Virology*, 80: 3023-3027.
- Nishizawa T., Furuhashi M., Nagai T., Nakai T., Muroga K.** (1997) Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Applied Environmental Microbiology*, 63: 1633-1636.
- Nishizawa T., Muroga K., Arimoto M.** (1996) Failure of the polymerase chain reaction (PCR) method to detect striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) in striped jack, *Pseudocaranx dentex*, selected as spawners. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8: 332-334.

Nishizawa T., Mori K., Furuhashi M., Nakai T., Furusawa I., Muroga K.J. (1995)

Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *General Virology*, 76: 1563-1569.

Nishizawa T., Mori K., Nakai T., Furusawa I., Muroga K. (1994) Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Diseases of Aquatic Organisms*, 18: 103-107.

Nuñez-Ortiz N., Stocchi V., Toffan A., Pascoli F., Sood N., Buonocore F., Picchietti S., Papeschi C., Taddei A.R., Thompson K.D., Scapigliati G. (2015) Quantitative immunoenzymatic detection of viral encephalopathy and retinopathy virus (betanodavirus) in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Journal of Fish Diseases*, 39: 821–831.

Nylund A., Watanabe K., Nylund S., Karlsen M., Sæther P.A., Arnesen C.E., Karlsbakk E. (2008) Morphogenesis of salmonid gill poxvirus associated with proliferative gill disease in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. *Archives of Virology*, 153: 1299–1309.

Oh M.J., Takami I., Nishizawa T., Kim W.S., Kim C.S., Kim S.R., Park M.R. (2012) Field tests of Poly (I: C) immunization with nervous necrosis virus (NNV) in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *Journal of Fish Diseases*, 35: 87-191.

OIE, World Organisation for Animal Health (2016) Viral encephalopathy and retinopathy. In: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, Part 2, Section 2.3, Chapter 2.3.12, http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_viral_encephalopathy_retinopathy.pdf.

Olsen Y.A., Press C.M. (1997) Degradation kinetics of immunoglobulin in the egg, alevin and fry of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and the localization of immunoglobulin in the egg. *Fish and Shellfish Immunology*, 7: 81-91.

Olveira J.G., Souto S., Dopazo C.P., Thiery R., Barja J.L., και Bandin I. (2009) Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortment. *Journal of General Virology*, 90: 2940–2951.

Olveira J.G., Soares F., Engrola S., Dopazo C.P., Bandin I. (2008). Antemortem versus postmortem methods for detection of betanodavirus in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20: 215–219.

Øvergård A.C., Nerland A.H., Fiksdal I.U., Patel S. (2012a) Atlantic halibut experimentally infected with nodavirus shows increased levels of T-cell marker and IFN gamma transcripts. *Developmental and Comparative Immunology*, 37: 139-150.

Øvergård A.C., Nepstad I., Nerland A.H., Patel S. (2012b) Characterisation and expression analysis of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) cytokines: IL-1 β , IL-6, IL-11, IL- 12 β and IFN γ . *Molecular Biology Reports*, 39: 2201–2213.

Pakingking R.Jr., Bautista N.B., de Jesus-Ayson E.G., Reyes O. (2010) Protective immunity against viral nervous necrosis (VNN) in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscogutattus*) following vaccination with inactivated betanodavirus. *Fish and Shellfish Immunology*, 28: 525-533.

Pakingking R. Jr., Seron R., dela Pena L., Mori K., Yamashita H., Nakai T. (2009) Immune responses of Asian sea bass, *Lates calcarifer* Bloch, against an inactivated betanodavirus vaccine. *Journal of Fish Diseases*, 32: 457-463.

Panzarin V., Toffan A., Abbadi M., Buratin A., Mancin M., Braaen S., Olsen C.M., Bargelloni L., Rimstad E., Cattoli G. (2016) Molecular Basis for Antigenic Diversity of Genus *Betanodavirus*. *PLoS ONE*, 11 (7): e0158814.

Panzarin V., Fusaro A., Monne I., Cappellozza E., Patarnello P., Bovo G., Capua I., Holmesd E.C., Cattoli G. (2012) Molecular epidemiology and evolutionary

dynamics of betanodavirus in southern Europe. *Infection, Genetics and Evolution*, 12 (1): 63–70.

Panzarin V., Patarnello P., Mori K., Rampazzo E., Cappellozza E., Bovo G., Cattoli G. (2010) Development and validation of a real-time TaqMan PCR assay for the detection of betanodavirus in clinical specimens. *Archives of Virology*, 155: 1193–1203.

Parameswaran V., Kumar S.R., Hameed Ahmed A.S. (2008) A fish nodavirus associated with mass mortality in hatchery-reared Asian sea bass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 275: 366–9.

Parameswaran V., Ishaq Ahmed V.P., Shukla R.R., Bhonde R., Sahul Hameed A.S. (2007) Development and characterization of two new cell lines from milkfish (*Chanos chanos*) and grouper (*Epinephelus coioides*) for virus isolation. *Marine Biotechnology*, 9: 281-291.

Parameswaran V., Shukla R., Bhonde R.R., Sahul Hameed A.S. (2006) Splenic cell line from sea bass, *Lates calcarifer*: establishment and characterization. *Aquaculture*, 257: 92–103.

Peducasse S., Castric J., Thiery R., Jeffroy L., Le Ven A., Baudin Laurencin F. (1999) Comparative study of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass *Dicentrarchus labrax* infected in different ways. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36 (1): 11-20.

Pichersky E., Noel J., Dudareva N. (2006) Biosynthesis of plant volatiles: Nature's Diversity and ingenuity. *Science*, 10: 808-811.

Pilau M.R., Alves S.H., Weiblen R., Arenhart S., Cueto A.P., Lovato L.T. (2011) Antiviral activity of the lippia graveolens (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *British Journal of Microbiology*, 42: 1616-1624.

Poisa-Beiro L., Dios S., Montes A., Aranguren R., Figueras A., Novoa B. (2008) Nodavirus increases the expression of Mx and inflammatory cytokines in fish brain. *Molecular Immunology*, 45: 218–225.

Pusceddu A., Frascchetti S., Holmer M., Mirto S., Danovaro R. (2007). Effects of intensive mariculture on sediment biochemistry. *Ecological Applications*, 17: 1366–1378.

Rali T., Wossa S.W., Leach D.N. (2007) Comparative chemical analysis of the essential oil constituents in the bark, heartwood and fruits of *Cryptocarya massoy* (Oken) Kosterm. (Lauraceae) from Papua New Guinea. *Molecules Basel Switzerland*, 12 (2): 149-154.

Renault T., Haffner Ph., Baudin Laurencin F., Brevil G., Bonami J.R. (1991) Mass mortality in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae associated with the presence in the brain and retina of virus-like particles. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 11: 68–73.

Reyes-Cerpa S., Maisey K., Reyes-Lopez F., Toro-Ascuy D., Mara A., Imarai M. (2012) Fish Cytokines and Immune Response. In: *New advances and contributions to fish biology*, vol. 1, edited by Turker H. InTech, Croatia, 3–58.

Robertsen B. (2006) The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 172-191.

Rocío M., E Ocazonez R., Martínez J.R., Stashenko E.E. (2009) Inhibitory effect of essential oils obtained from plants grown in Colombia on yellow fever virus replication in vitro. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8: 8.

Romestand B., Bonami J.R. (2003) A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (S-ELISA) for detection of MrNV in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Fish Diseases*, 26: 71–75.

Sahul Hameed A.S., Parameswaran V., Ravi Sukla Singh B., Bhonde R. (2006) Establishment and characterization of India's first marine fish cell line from kidney of sea bass, *Lates calcarifer*. *Aquaculture*, 257: 92–103.

Samuelsen O.B., Nerland A.H., Jorgensen T., Schroder M.B., Saand T., Bergh O. (2006) Viral and bacterial diseases of Atlantic cod *Gadus morhua*, their prophylaxis and treatment: a review. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71: 239–254.

Scapigliati G., Buonocore F., Randelli E., Casani D., Meloni S., Zarletti G., Tiberi M., Pietretti D., Boschi I., Manchado M., Martin-Antonio B., Jimenez-Cantizano R., Bovo G., Borqhesan F., Lorenzen N., Einer-Jensen K., Adams S., Thompson K., Alonso C., Bejar J., Cano I., Borrego J.J., Alvarez M.C. (2010) Cellular and molecular immune responses of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with betanodavirus. *Fish and Shellfish Immunology*, 28: 303–311.

Scapigliati G., Mazzini M., Mastrolia M., Romano N., Abelli L. (1996) Production and characterization of a monoclonal antibody against the thymocytes of the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostea, Percichthyidae). *Fish and Shellfish Immunology*, 6: 383–401.

Scherer W.F., Hurlbut H.S. (1967) Nodamura virus from Japan: A new and unusual arbovirus resistant to diethyl ether and chloroform. *American Journal of Epidemiology*, 86: 271-285.

Schneemann A., Marshall D. (1998) Specific Encapsidation of Nodavirus RNAs is mediated through the C Terminus of Capsid Precursor Protein Alpha. *Journal of Virology*, 72: 8738-8746.

Shetty M., Maiti B., Santhosh K.S., Venugopal M.N., Karunasagar I. (2012) Betanodavirus of marine and freshwater fish: distribution, genomic organization, diagnosis and control measures. *Indian Journal of Virology: An Official Organ of Indian Virological Society*, 23: 114–123.

Sideris D.C. (1997): Cloning, expression and purification of the coat protein of encephalitis virus (DIEV) infecting *Dicentrarchus labrax*. *Biochemistry and molecular biology international*, 42: 409-417.

Skliris G.P., Krondiris J.V., Sideris D.C., Shinn A.P., Starkey W.G., Richards R.H. (2001) Phylogenetic and antigenic characterization of new fish nodavirus isolates from Europe and Asia. *Virus Research*, 75 (1): 59-67.

Skliris G.P., Richards R.H. (1999) Induction of nodavirus disease in seabass, *Dicentrarchus labrax*, using different infection models. *Virus Research*, 63: 85–93.

Skoula M., Harborne J.B. (2002) The taxonomy and chemistry of *Origanum*. In: Kintzios SE (ed) Medicinal and aromatic plants-Industrial profiles, *Oregano*. The genera *Origanum* and *Lippia*, vol 25. Taylor and Francis, London, pp 67–108.

Sommerset I., Skern R., Biering E., Bleie H., Uglenes Fiksdal I., Grove S., Nerland A.H. (2005) Protection against Atlantic halibut nodavirus in turbot is induced by recombinant capsid protein vaccination but not following DNA vaccination. *Fish and shellfish immunology*, 18: 13-29.

Sommerset I., Lorenzen E., Lorenzen N., Bleie H., Nerland A.H. (2003) A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. *Vaccine*, 21: 4661-4667.

Souto S., Lopez-Jimena B., Alonso M.C., García-Rosado E., Bandín I. (2015) Experimental susceptibility of European sea bass and Senegalese sole to different Betanodavirus isolates. *Veterinary Microbiology*, 177: 53–61.

Starkey W.G., Ireland J.H., Muir K.F., Jenkins M.E., Roy W.J., Richards R.H., Ferguson H.W. (2001) Nodavirus infection in Atlantic cod and Dover sole in the UK. *Veterinary Record*, 146: 179–181.

Starkey W.G., Ireland J.H., Muir K.F., Shinn A.P., Richards R.H., Ferguson H.W. (2000) Isolation of nodavirus from Scottish farmed halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L). *Journal of Fish Diseases*, 418–422.

Su Y., Xu X., Ma H., Feng J., Wen W., Guo Z. (2015a) Dynamic distribution and tissue tropism of nervous necrosis virus in juvenile pompano (*Trachinotus ovatus*) during early stages of infection. *Aquaculture*, 440: 25-31.

Su Y.C., Wang C.H., Chang W.H., Chen T.Y., Lee G.B. (2015b) Rapid and amplification-free detection of fish pathogens by utilizing a molecular beacon-based microfluidic system. *Biosensors and Bioelectronics*, 63: 196–203.

Takizawa N., Adachi K., Kobayashi N. (2008) Establishment of reverse genetics system of Betanodavirus for the efficient recovery of infectious particles. *Journal of Virological Methods*, 151: 271-275.

Tanaka S., Takagi M., Miyazaki T. (2004) Histopathological studies on viral nervous necrosis of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, at the grow-out stage. *Journal of Fish Diseases*, 27 (7): 385–399.

Tanaka S., Mori K., Arimoto M., Iwamoto T., Nakai T. (2001) Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *Journal of Fish Diseases*, 24: 15-22.

Tanaka A., Aoki H., Nakai T. (1998) Pathogenicity of the nodavirus detected from diseased sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. *Fish Pathology*, 33: 31–36.

Thiéry R., Cozien J., Cabon J., Lamour F., Baud M., Schneemann A.J. (2006) Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *Journal of Virology*, 80 (20): 10201-10207.

Thiery R., Cozien J., de Boisseson C., Kerbart-Boscher S., Nevarez L. (2004) Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity. *Journal of General Virology*, 85: 3079-3087.

Thiery R., Arnauld C., Delsert C. (1999a) Two isolates of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., nervous necrosis virus with distinct genomes. *Journal of fish diseases*, 22: 201-207.

Thiery R., Raymond J.C., Castric J. (1999b) Natural outbreak of viral encephalopathy and retinopathy in juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*: study by nested reverse transcriptase- polymerase chain reaction. *Virus research*, 63: 11-17.

Toffolo V., Negrisolo E., Maltese C., Bovo G., Belvedere P., Colombo L., Dalla Valle L. (2007) Phylogeny of Betanodaviruses and molecular evolution of their RNA polymerase and coat proteins. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 298-308.

Toubanaki D.K., Margaroni M., Karagouni E. (2015) Nanoparticle-based lateral flow biosensor for visual detection of fish nervous necrosis virus amplification products. *Molecular and Cellular Probes*, 29 (3): 158–166.

Tu J., Chen W., Fu X., Lin Q., Chang O., Zhao L., Lan J., Li N., Lin L. (2016) Susceptibility of Chinese Perch Brain (CPB) cell and Mandarin fish to Red-Spotted Grouper Nervous Necrosis Virus (RGNNV) infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 740.

Ucko M., Colorni A., Diamant A. (2004) Nodavirus infections in Israeli mariculture. *Journal of Fish Diseases*, 27: 459–469.

Vendramin N., Toffan A., Mancin M., Cappellozza E., Panzarin V., Bovo G., Cattoli G., Capua I., Terregino C. (2014) Comparative pathogenicity study of ten different betanodavirus strains in experimentally infected European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 37: 371–383.

Vendramin N., Patarnello P., Toffan A., Panzarin V., Cappellozza E., Tedesco P., Terlizzi A., Terregino C., Cattoli G. (2013) Viral Encephalopathy and Retinopathy in groupers (*Epinephelus* spp.) in southern Italy: a threat for wild endangered species? *BMC Veterinary Research*, 9: 20.

Vendramin N., Padrós F., Pretto T., Cappellozza E., Panzarin V., Bovo G., Terregino C. (2012) Viral encephalopathy and retinopathy outbreak in restocking facilities of the endangered freshwater species, *Salaria fluviatilis* (Asso). *Journal of Fish Diseases*, 35: 867–871.

Vimal S., Madan N., Farook M.A., Nambi K.S.N., Majeed S.A., Rajkumar T., Venu S., Thirunavukkarasu A.R., Sahul Hameed A.S. (2014) Production of recombinant vaccine using capsid gene of nodavirus to protect Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790). *Aquaculture*, 418-419: 148-154.

Viral Zone. http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/614.html

- Volpatti D., Bulfon C., Tulli F., Galeotti M.** (2013) Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum* of *Dicentrarchus labrax* fed carvacrol supplemented diets. *Aquaculture Research*, 45: 31–44.
- Wang Y.D., Rajanbabu V., Chen J.Y.** (2015) Transcriptome analysis of medaka following epinecidin-1 and TH1-5 treatment of NNV infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 42 (1): 121-131.
- Wang C.H., Lien K.Y., Wang T.Y., Chen T.Y., Lee G.B.** (2011) An integrated microfluidic loop- mediated-isothermal-amplification system for rapid sample pre-treatment and detection of viruses. *Biosensors and Bioelectronics*, 26: 2045–2052.
- Watanabe K., Ide K., Iwasaki T., Satoh J., Mori K.I., Mekata T.** (2013) Disinfection of fertilized grouper eggs with electrolyzed seawater for prevention of Viral Nervous Necrosis. *Fish Pathology*, 48: 5-8.
- Watanabe K., Nishizawa T., Yoshimizu M.** (2000) Selection of broodstock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 41: 219–223.
- Watanabe K., Yoshimizu M.** (1998) Disinfection of Equipments for Aquaculture and Fertilized Eggs by Ozonated Seawater. *Fish Pathology*, 33: 135-146.
- Wi G.R., Hwang J.Y., Kwon M.G., Kim H.J., Kang H.A., Kim H.J.** (2015) Protective immunity against nervous necrosis virus in convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* following vaccination with virus-like particles produced in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Veterinary Microbiology*, 177: 214-218.
- Wistom G., Richardson J., Jaworski C., Graham C., Shron-Friling R., Segovia L.** (1994) Crystallins: the over-expression of functional enzymes and stress proteins in the eye lens. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 12: 1-38.
- Wu H.C., Chiu C.S., Wu J.L., Gong H.Y., Chen M.C., Lu M.W., Hong J.R.** (2008) Zebrafish anti- apoptotic protein zBcl-x(L) can block betanodavirus protein alpha-induced mitochondria- mediated secondary necrosis cell death. *Fish and Shellfish Immunology*, 24: 436–449.

- Xu H.D., Feng J., Guo Z.X., Ou Y.J., Wang J.Y.** (2010) Detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, 163: 123–128.
- Yamashita H., Mori K., Kuroda A., Nakai T.** (2009) Neutralizing antibody levels for protection against betanodavirus infection in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg), immunized with an inactivated virus vaccine. *Journal of Fish Diseases*, 32: 767-775.
- Yamashita H., Fujita Y., Kawakami H., Nakai T.** (2005) The efficacy of inactivated virus vaccine against Viral Nervous Necrosis (VNN). *Fish Pathology*, 40: 15-21.
- Yang S.Y., Wu J.L., Tso C.H., Ngou F.H., Chou H.Y., Nan F.H., Horng H.E., Lu M.W.** (2012) A novel quantitative immunomagnetic reduction assay for nervous necrosis virus. *Journal of Veterinary Diagnostic*, 24: 911–917.
- Yang W.Z., Benchaar C., Ametaj B.N., Chaves A.V., He M.L., McAllister T.A.** (2007) Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. *Journal of dairy science*, 90 (12): 5671-81.
- Yoshikoshi K., Inoue K.** (1990) Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck and Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 13: 69-77.
- Yuasa K., Koesharyani I., Mahardika K.** (2007) Effect of high water temperature on betanodavirus infection of fingerling Humpback grouper (*Cromileptes altivelis*). *Fish Pathology*, 42: 219–221.
- Yuasa K., Koesharyani I., Roza D., Mori K., Katata M., Nakai T.** (2002) Immune response of humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes) injected with recombinant coat protein of betanodavirus. *Journal of Fish Diseases*, 25: 53-56.
- Zafran K.I., Johnny F., Yuasa K., Harada T., Hatai K.** (2000) Viral nervous necrosis in humpback grouper *Cromileptes altivelis* larvae and juveniles in Indonesia. *Fish Pathology*, 35: 95–6.

Zheng Z.L., Tan J.Y.W., Liu H.Y., Zhou X.H., Xiang X., Wang K.Y. (2009). Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 292(3–4), 214–218.

Volpatti D., Bulfon C., Tulli F., Galeotti M. (2013) Growth parameters, innate immune response and resistance to *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum* of *Dicentrarchus labrax* fed carvacrol supplemented diets. *Aquaculture Research*, 45: 31–44.

Zorriehzahra M.J., Nazari A., Ghasemi M., Ghiasi M., Haghighi Karsidani S., Giuseppe B., Mohd Daud H.H. (2014) Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of wild Golden grey mullet (*Liza aurata*) and Sharpnose grey mullet (*Liza saliens*) in Iranian waters of the Caspian Sea. *Virus Diseases*, 25 (4): 430–436.

Αθανασοπούλου Φ. (2005) Διδακτικές Σημειώσεις του μαθήματος της Ιχθυοπαθολογίας. Νοσήματα των εκτρεφόμενων ψαριών στην Ελλάδα, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας.

Γιαγνίση Μ. (2011) Επίδραση της δραστηριότητας STRESS και του αιθέριου ελαίου ρίγανης στη μικροβιακή χλωρίδα των εκτρεφόμενων ιχθύων στην Ελλάδα. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Λάμπου Ε. (2017) Επιδημιολογική μελέτη του ιού Noda σε αλιεύματα, δίθυρα και ιχθείς και μελέτη της παθογένειάς του στο λαβράκι σε σχέση με τον εντοπισμό της πύλης εισόδου του ιού στον οργανισμό και τον τρόπο εξάπλωσής του στους ιστούς του ψαριού. Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 7: Περιγραφική ανάλυση τίτλων ιού RGNNV μεταξύ των τριών πειραματικών ομάδων σε κάθε χρονικό σημείο

Three days p.i.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
control	4	8,271	,3326	,1663	7,741	8,800	7,8	8,5
1000ppm	4	9,689	,9171	,4585	8,230	11,148	8,7	10,8
2000ppm	4	7,377	1,7236	,8618	4,635	10,120	5,1	8,8
Total	12	8,446	1,4346	,4141	7,534	9,357	5,1	10,8

Four days p.i.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
control	4	8,423	2,5354	1,2677	4,389	12,457	4,7	10,4
1000ppm	4	10,366	,6434	,3217	9,343	11,390	9,8	11,2
2000ppm	4	9,716	,4510	,2255	8,999	10,434	9,2	10,2
Total	12	9,502	1,6227	,4684	8,471	10,533	4,7	11,2

Seven days p.i.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
control	4	10,634	,0765	,0382	10,512	10,756	10,5	10,7
1000ppm	4	10,696	,3393	,1697	10,156	11,236	10,3	11,1
2000ppm	4	10,420	,2704	,1352	9,990	10,850	10,1	10,7
Total	12	10,583	,2612	,0754	10,417	10,749	10,1	11,1

Fourteen days p.i.

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
control	4	8,441	,2809	,1405	7,994	8,888	8,1	8,8
1000ppm	4	8,905	,4517	,2259	8,186	9,624	8,3	9,3
2000ppm	4	8,249	,3051	,1525	7,764	8,735	7,8	8,4
Total	12	8,532	,4303	,1242	8,258	8,805	7,8	9,3

Πίνακας 8: Έλεγχος κανονικότητας των δεδομένων (τίτλοι ιού RGNNV)

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Three days	Four days	Seven days	Fourteen days
N		12	12	12	12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	8,446	9,502	10,583	8,532
	Std. Deviation	1,4346	1,6227	,2612	,4303
Most Extreme Differences	Absolute	,202	,284	,180	,199
	Positive	,158	,194	,164	,199
	Negative	-,202	-,284	-,180	-,107
Kolmogorov-Smirnov Z		,700	,983	,625	,689
Asymp. Sig. (2-tailed)		,711	,289	,830	,729

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Πίνακας 9: Έλεγχος ομοιογένεια των δεδομένων (τίτλοι ιού RGNNV)

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
Three days	4,432	2	9	,046
Four days	4,149	2	9	,053
Seven days	2,665	2	9	,123
Fourteen days	,614	2	9	,562

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + group
Within Subjects Design: TP

Πίνακας 10: Έλεγχος σφαιρικότητας των δεδομένων (τίτλοι ιού RGNNV)

Mauchly's Test of Sphericity^a

Measure: MEASURE_1

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	Df	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
TP	,246	10,845	5	,056	,604	,917	,333

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. Design: Intercept + group
Within Subjects Design: TP

b. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

Πίνακας 11: Έλεγχοι στατιστικών υποθέσεων με ανάλυση διακύμανσης

ANOVA

Three days p.i.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10,870	2	5,435	4,157	,053
Within Groups	11,767	9	1,307		
Total	22,638	11			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: τίτλοι ιού RGNNV την τρίτη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό
Bonferroni

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control	1000ppm	-1,4184	,8085	,340	-3,790	,953
	2000ppm	,8932	,8085	,894	-1,479	3,265
1000ppm	control	1,4184	,8085	,340	-,953	3,790
	2000ppm	2,3116	,8085	,056	-,060	4,683
2000ppm	control	-,8932	,8085	,894	-3,265	1,479
	1000ppm	-2,3116	,8085	,056	-4,683	,060

ANOVA

Four days p.i

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7,829	2	3,915	1,667	,242
Within Groups	21,137	9	2,349		
Total	28,966	11			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: τίτλοι ιού RGNNV την τέταρτη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό
Bonferroni

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control	1000ppm	-1,9434	1,0836	,319	-5,122	1,235
	2000ppm	-1,2931	1,0836	,790	-4,472	1,885
1000ppm	control	1,9434	1,0836	,319	-1,235	5,122
	2000ppm	,6503	1,0836	1,000	-2,528	3,829
2000ppm	control	1,2931	1,0836	,790	-1,885	4,472
	1000ppm	-,6503	1,0836	1,000	-3,829	2,528

ANOVA

Seven days p.i.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,168	2	,084	1,299	,319
Within Groups	,582	9	,065		
Total	,750	11			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: τίτλοι ιού RGNNV την έβδομη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό
Bonferroni

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control	1000ppm	-,0625	,1799	1,000	-,590	,465
	2000ppm	,2139	,1799	,794	-,314	,742
1000ppm	control	,0625	,1799	1,000	-,465	,590
	2000ppm	,2764	,1799	,476	-,251	,804
2000ppm	control	-,2139	,1799	,794	-,742	,314
	1000ppm	-,2764	,1799	,476	-,804	,251

ANOVA

Fourteen days p.i.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,909	2	,455	3,627	,070
Within Groups	1,128	9	,125		
Total	2,037	11			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: τίτλοι ιού RGNNV την δέκατη τέταρτη ημέρα μετά τον ενοφθαλμισμό
Bonferroni

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control	1000ppm	-,4637	,2503	,291	-1,198	,271
	2000ppm	,1920	,2503	1,000	-,542	,926
1000ppm	control	,4637	,2503	,291	-,271	1,198
	2000ppm	,6557	,2503	,084	-,079	1,390
2000ppm	control	-,1920	,2503	1,000	-,926	,542

1000ppm	-,6557	,2503	,084	-1,390	,079
---------	--------	-------	------	--------	------

Πίνακας 12: έλεγχος στατιστικής υπόθεσης με ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: τίτλοι ιού RGNNV ανά χρονικό σημείο

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TP	Sphericity Assumed	36,036	3	12,012	13,185	,000
	Greenhouse-Geisser	36,036	1,813	19,873	13,185	,001
	Huynh-Feldt	36,036	2,750	13,106	13,185	,000
	Lower-bound	36,036	1,000	36,036	13,185	,005
TP * group	Sphericity Assumed	9,684	6	1,614	1,772	,143
	Greenhouse-Geisser	9,684	3,627	2,670	1,772	,186
	Huynh-Feldt	9,684	5,499	1,761	1,772	,151
	Lower-bound	9,684	2,000	4,842	1,772	,225
Error(TP)	Sphericity Assumed	24,598	27	,911		
	Greenhouse-Geisser	24,598	16,320	1,507		
	Huynh-Feldt	24,598	24,747	,994		
	Lower-bound	24,598	9,000	2,733		

Tests of Within-Subjects Contrasts

Measure: τίτλοι ιού RGNNV ανά χρονικό σημείο

Source	TP	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
TP	Linear	1,077	1	1,077	1,672	,228
	Quadratic	28,975	1	28,975	28,010	,000
	Cubic	5,985	1	5,985	5,674	,041
TP * group	Linear	3,427	2	1,713	2,661	,124
	Quadratic	2,955	2	1,477	1,428	,289
	Cubic	3,302	2	1,651	1,565	,261
Error(TP)	Linear	5,796	9	,644		
	Quadratic	9,310	9	1,034		
	Cubic	9,493	9	1,055		

Pairwise Comparisons

Measure: τίτλοι ιού RGNNV ανά χρονικό σημείο

(I) TP	(J) TP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
					Lower Bound	Upper Bound

	4d	-1,056	,545	,507	-2,889	,776
3d	7d	-2,138*	,324	,001	-3,228	-1,047
	14d	-,086	,323	1,000	-1,172	1,000
	3d	1,056	,545	,507	-,776	2,889
4d	7d	-1,081	,423	,185	-2,504	,342
	14d	,970	,449	,354	-,540	2,481
	3d	2,138*	,324	,001	1,047	3,228
7d	4d	1,081	,423	,185	-,342	2,504
	14d	2,052*	,156	,000	1,526	2,578
	3d	,086	,323	1,000	-1,000	1,172
14d	4d	-,970	,449	,354	-2,481	,540
	7d	-2,052*	,156	,000	-2,578	-1,526

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

b. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

Multiple Comparisons

Measure: τίτλοι ιού RGNNV ανά ομάδα

Bonferroni

(I) group	(J) group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	1000ppm	-,972	,3730	,085	-2,066	,122
	2000ppm	,002	,3730	1,000	-1,093	1,096
1000ppm	control	,972	,3730	,085	-,122	2,066
	2000ppm	,973	,3730	,085	-,121	2,068
2000ppm	control	-,002	,3730	1,000	-1,096	1,093
	1000ppm	-,973	,3730	,085	-2,068	,121

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,278.

Πίνακας 13: Περιγραφική ανάλυση ημερήσιου ποσοστού θνησιμότητας

Descriptives

mort

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
control	8	10,2250	8,36348	2,95694	3,2330	17,2170	1,30	25,00
1000ppm	8	9,7125	7,81691	2,76370	3,1774	16,2476	1,60	21,60
2000ppm	7	11,0143	5,45112	2,06033	5,9728	16,0557	5,60	21,60
Total	23	10,2870	7,07758	1,47578	7,2264	13,3475	1,30	25,00

Πίνακας 14: έλεγχος κανονικότητας δεδομένων ημερήσιου ποσοστού θνησιμότητας

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
control	,176	7	,200*	,915	7	,435

treat1000	,223	7	,200*	,881	7	,229
treat2000	,266	7	,143	,859	7	,147

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Πίνακας 15: Έλεγχος ομοιογένειας δεδομένων ημερήσιου ποσοστού θνησιμότητας

Test of Homogeneity of Variances

Ημερήσιο ποσοστό θνησιμότητας

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,207	2	20	,320

Πίνακας 16: Έλεγχος στατιστικής υπόθεσης με ανάλυση διακύμανσης

ANOVA

Ημερήσιο ποσοστό θνησιμότητας

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6,374	2	3,187	,058	,944
Within Groups	1095,652	20	54,783		
Total	1102,026	22			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ημερήσιο ποσοστό θνησιμότητας
Bonferroni

(I) groups	(J) groups	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
control	1000ppm	,51250	3,70076	1,000	-9,1561	10,1811
	2000ppm	-,78929	3,83065	1,000	-10,7972	9,2186
1000ppm	control	-,51250	3,70076	1,000	-10,1811	9,1561
	2000ppm	-1,30179	3,83065	1,000	-11,3097	8,7061
2000ppm	control	,78929	3,83065	1,000	-9,2186	10,7972
	1000ppm	1,30179	3,83065	1,000	-8,7061	11,3097